UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 N° 819

UN ANTITUBERCULEUX D'ADAPTATION ÉLABORÉ PAR ASPERGILLUS AMSTELODAMI

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

HANS TSCHUPP
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550011_0007

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 N° 819

UN ANTITUBERCULEUX D'ADAPTATION ÉLABORÉ PAR ASPERGILLUS AMSTELODAMI

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 1961
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

HANS TSCHUPP
Pharmacien

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1961

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. DUQUÉNOIS, *Doyen*, ✻, I. ✪, ✪
GAZET DU CHATELIER, *Assesseur*, I. ✪
CLADY, *Secrétaire*, I. ✪

PROFESSEURS :

MM.	LAPP, ✻, I. ✪	Physique
	SARTORY, O. ✻, I. ✪, O. ✪	Bactériologie
	CORDIER, ✻, I. ✪	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ✻, I. ✪, ✪	Matière médicale
	JAEGER, I. ✪, ✪	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I. ✪	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	EBEL, ✻, ✪ I. ✪	Chimie biologique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ✪, ✪	Sciences naturelles
	MÉTAIS	Sciences appliquées
	MALGRAS	Sciences naturelles
	LAUSTRIAT	Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :
M. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie analyt. et séméiolog.
	LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techn.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	C. MEYER	Comptabilité et fiscalité pharmaceutiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

Mme	KRISTENSEN		Chimie pharmaceutique
MM.	MATHIS		Chimie
	CARBIENER	(chargés des fonctions)	Histoire naturelle
	STAHL		Bactériologie et Parasitologie
	C. F. LAPP		Chimie et Physique
	ROMOND		Bactériologie

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur Ch. LAPP

Professeur de Physique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER

Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A mes parents,

en reconnaissance pour tout ce qu'ils ont fait pour moi,
faible témoignage de mon affection filiale.

INTRODUCTION

Au temps de Louis PASTEUR et de Robert KOCH, la bactériologie a vécu son âge d'or; les scientifiques et les médecins ont appris à entrevoir les phénomènes de la lutte entre l'*organisme humain et le microbe envahisseur*. On a ainsi constaté que la pénétration d'un corps étranger dans le système sanguin provoque un processus de phagocytose et d'immunisation. On a également constaté que certaines bactéries étaient capables de détruire les phagocytes. Puis on a pu mettre en évidence l'apparition dans l'organisme infecté de certaines substances nouvelles, qu'on a appelées « *anticorps* » et qui sont capables d'inactiver ou de détruire les microbes pathogènes.

On a d'autre part constaté que les bactéries sont riches en ferments divers, nécessaires à leur vie et qu'elles peuvent synthétiser des *enzymes d'adaptation* selon le milieu ambiant dans lequel elles vivent. C'est ainsi que sont nées la vaccination préventive et curative, ainsi que la sérothérapie.

Cependant, PASTEUR et KOCH prévoyaient déjà qu'il arriverait un moment où l'on pourrait lutter contre l'*infection microbienne par la chimiothérapie*. Quelque dix ans plus tard, en effet, on a découvert *les premiers antiseptiques* efficaces contre les bactéries. C'était le temps précurseur des *sulfamides et des antibiotiques*.

Un coup d'œil sur ces trente dernières années révèle que cette lutte anti-infectieuse présente d'importantes lacunes; en effet, les bactéries deviennent résistantes à ces nouveaux médicaments avec plus ou moins de facilité, par l'élaboration *d'enzymes d'adaptation*. Ce phénomène peut aller plus loin encore : la bactérie non seulement s'habitue à ces substances, mais encore elle peut les exiger, à la longue, pour survivre.

Mentionnons de plus un autre inconvénient de *la chimiothérapie :* comme il s'agit le plus souvent de produits qui influencent le métabolisme des micro-organismes, *leurs antigènes* sont modifiés ou lésés, de sorte que leur action est inhibée et l'organisme infecté n'élabore plus d'anticorps spécifiques. Ainsi, l'aide apportée par l'organisme malade est plus ou moins inhibée, ce qui facilite la pullulation de l'agent infectant. Ce phénomène a fait l'objet d'une publication spéciale, en novembre 1959, dans les *Annales de l'Institut Pasteur* (T. 97 p. 613-752 et Supplément au N° 5 T. 97).

Pour toutes ces raisons, on a instauré dans ces derniers temps des méthodes thérapeutiques faisant alterner *les antibiotiques et les sulfa-*

mides qui étaient presque tombés en désuétude, et que l'on a repris dans ces conditions avec plus ou moins de succès.

En résumé, on peut dire que les prévisions de PASTEUR et de KOCH ne se sont pas entièrement réalisées, puisque ces pionniers ne pouvaient pas prévoir la capacité d'*adaptation des bactéries*. En effet, un simple changement dans leur nourriture ou leurs conditions de vie, l'apparition ou la disparition d'une quantité infinitésimale d'un aliment quelconque, suffit à modifier le comportement de ces micro-organismes.

Les observations de JAVILLIER et BERTRAND démontrent l'importance fondamentale des *oligo-éléments* dans la nutrition microbienne. Ils ont ainsi prouvé l'extraordinaire plasticité des micro-organismes; ce fait caractérise essentiellement l'étonnante aptitude *des bactéries et des champignons inférieurs* à se plier à des nutritions diverses, à tirer parti de tous les éléments, même de ceux « a priori » nuisibles ou inutilisables et que l'expérimentateur met volontairement à leur disposition. Ainsi, leur capacité de synthétiser *des ferments d'adaptation ou d'autres substances de défense* pourrait obliger certains micro-organismes choisis à attaquer *une bactérie pathogène donnée*, même si initialement ils en étaient incapables.

Cette mobilisation de la lutte entre champignons et bactéries, *cet antagonisme*, fait l'objet de notre travail. En effet, depuis de nombreuses années, J. MEYER avait observé *que des cultures de Bacille de Koch sur jus de pomme de terre glycériné gélosé ou sur milieu de Lœwenstein-Jensen insuffisamment stérilisé, sont le plus souvent contaminées par un Aspergillus envahissant strictement les colonies*. La tâche qui nous a été fixée était de déterminer *cette moisissure* et de contrôler la production éventuelle *d'une substance antibiotique antituberculeuse*.

Avant d'entrer dans le vif du sujet, qu'il nous soit permis de remercier ici Monsieur R. SARTORY, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg;* après nous avoir aimablement accueilli dans son laboratoire, il a toujours suivi nos travaux avec le plus grand intérêt, et nous fait aujourd'hui l'honneur de présider notre Jury.

Notre reconnaissance va également à Monsieur Ch. LAPP, *Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour la gentillesse avec laquelle il a accepté de siéger dans ce jury.

Toute notre gratitude va à Monsieur J. MEYER, *ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg ;* après nous avoir suggéré le sujet de notre travail, il nous a encouragé dans nos efforts et éclairé de ses lumières, nous aidant dans la mesure du possible à mener notre tâche à bien.

Nous voudrions aussi exprimer à Monsieur J. MALGRAS, *Maître de Conférences de Sciences Naturelles à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, et à toutes les autres personnes que nous avons rencontrées dans *le si sympathique service de Bactériologie*, notre sincère reconnaissance pour leur cordiale amitié, et les assurer de notre durable souvenir.

PLAN DE TRAVAIL

Notre travail comporte deux parties : *l'historique* et les *travaux personnels.*

L'historique est divisé en quatre chapitres, dont le premier a trait *aux problèmes de l'antibiose*, c'est-à-dire à l'élaboration d'un principe naissant de la concurrence vitale.

Dans le second chapitre, nous étudions *les problèmes soulevés par l'antibio- et la chimiothérapie.* Nous envisageons les effets secondaires des antibiotiques sur l'organisme, l'action antivitaminique et les phénomènes de surinfection bactérienne ou fungique. En dernier lieu, nous envisageons l'apparition de *la résistance microbienne* aux antibiotiques.

Le troisième chapitre est réservé à l'exposé de *la thérapie antituberculeuse moderne.*

Le quatrième chapitre a trait à la question de *l'adaptation enzymatique* et aux *antibiotiques d'adaptation.*

Nos travaux personnels sont exposés dans cinq chapitres. Nous décrivons d'abord *l'isolement et la caractérisation de l'Aspergillus amstelodami*, organisme surinfectant souvent les cultures de *Bacille de Koch.* Des microphotographies illustrent cette partie de notre exposé.

Le chapitre sixième a trait à la *préparation de notre antibiotique d'adaptation.* Nous envisageons l'extraction et la purification de cette substance.

Dans le chapitre septième nous donnons les *propriétés physico-chimiques* principales de cet antibiotique d'adaptation, puis nous essayons d'élucider sa *composition* par chromatographie.

Les *expériences « in vitro »* font l'objet du chapitre huitième. Nos premiers essais ayant été peu démonstratifs, nous avons alors eu recours à des milieux de culture spéciaux *au sang ou au sérum.*

Le chapitre neuvième est consacré à nos *expériences « in vivo ».* Nous avons employé le cobaye tuberculisé auquel nous appliquons une médication à l'aide de l'*antibiotique d'adaptation seul ou associé à l'Isoniazide et à la Streptomycine.*

Les résultats sont interprétés en rapport avec les lésions anatomopathologiques macroscopiques, l'étude des coupes histologiques et la recherche du B.K. à l'examen direct et cultural dans les différents organes.

Des *conclusions générales* terminent notre exposé.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

L'ANTIBIOSE, PRINCIPE VITAL

Le terme *d'« antibiose »* a été créé en 1889 par P. Vuillemin (1) pour désigner le phénomène par lequel un organisme freine ou inhibe la vie d'un autre. Tyndall (2) a été le premier en 1876 à observer et à décrire ce phénomène; il dit textuellement : « *the struggle for existence between the Bacteria and the Penicillium. In some tubes the former were triumphant ; in other tubes of the same infusion the latter was triumphant. The Bacteria which manufacture a green pigment appear to be uniformly victorious in their fight with the Penicillium.* » (La lutte pour l'existence entre les bactéries et les champignons. Dans quelques tubes les premières étaient triomphantes; dans d'autres tubes de la même culture, les secondes étaient triomphantes. Les bactéries élaborant un pigment vert se sont toujours montrées victorieuses dans leur combat contre les champignons.)

Une année plus tard, Pasteur et Joubert (3) ont prouvé expérimentalement la réalité de l'antibiose, lors de leurs travaux sur *Bacillus anthracis*. Ils ont donné la description suivante : « *On peut introduire à profusion dans un animal la bactéridie charbonneuse sans que celui-ci contracte le charbon : il suffit qu'au liquide qui tient en suspension la bactéridie, on ait associé en même temps des bactéries communes.* »

Comme autre exemple du début de l'époque de la microbiologie, nous mentionnons de Bary (4) qui a constaté en 1879 que de deux organismes vivant simultanément dans le même substrat, *l'un évolue plus ou moins rapidement au détriment de l'autre.*

L'antibiose est un principe général de la vie, qui a comme conséquence de tuer l'organisme qui en est touché; elle a par conséquent un rôle important dans la sélection des espèces, dans le sens de Darwin. Cependant ce rôle est beaucoup plus grand que Darwin ne pouvait le prévoir, puisqu'à son époque les micro-organismes pathogènes n'étaient pas encore connus.

L'antibiose est l'inverse de la symbiose. La thérapie antibiotique a mis en évidence d'une façon très démonstrative l'importance de la symbiose entre l'homme et la flore bactérienne non pathogène; la suppression de cette dernière par l'emploi *des antibiotiques* a soulevé un problème très grave pour la thérapeutique et pour la médecine en général.

Ainsi, *la symbiose et l'antibiose* jouent un rôle beaucoup plus important que nous ne le supposions en ce qui concerne les organismes supérieurs. Nous sommes cependant conscients de la *vie symbiotique* (sociale) entre les êtres d'une espèce donnée, d'homme à homme, de singe à singe, chez les fourmis, les abeilles, etc., de même que de *l'antibiose* que constituent les guerres, la chasse, etc.; nous avons appris que la symbiose entre des êtres de nature aussi différente que l'homme et les microorganismes unicellulaires était primordiale pour l'équilibre vital, dont la rupture par l'antibiothérapie peut amener des troubles graves.

Il n'est donc pas étonnant que l'on ait effectué ces dernières années de nombreux essais pour tenter de guérir certaines infections à l'aide de bactéries non pathogènes ou naturellement symbiotiques. Mentionnons à ce sujet les *pharyngites et les amygdalites* si souvent récidivantes chez les enfants, qui ont été guéries par administration buccale de *Streptocoques saprophytes*, comme cela a été prouvé par les travaux de Rusch en 1955. Des résultats positifs ont été obtenus également dans des cas de *fièvre typhoïde*, guéris ou favorablement influencés par administration de *Colibacilles* isolés de la flore intestinale.

Il semble donc que la guérison par « *symbiose* » est tout aussi possible que celle par « *antibiose* ». Nous pouvons apprécier toute la portée de ces intéressantes expériences et des perspectives qu'elles ouvrent pour l'avenir, si nous les considérons sous l'angle de l'évolution du monde moderne selon Max Planck. En effet, on peut constater dans tous les secteurs de la vie, que la nature cherche son équilibre beaucoup plus dans l'harmonie de ses forces que dans leur lutte. Comme exemple, mentionnons dans la nature la dualité entre les ondes et la matière, dans le domaine spirituel la coexistence des trois grandes tendances religieuses que sont le christianisme, l'islamisme et le bouddhisme et dans le domaine politique la coexistence plus ou moins paisible du capitalisme et du communisme.

Nous laissons à d'autres chercheurs le soin d'approfondir dans l'avenir cette voie idéaliste que nous n'avons fait qu'effleurer. Quant à nous, il ne nous reste qu'à constater que l'humanité a relativement peu évolué, tant au point de vue spirituel que temporel, et principalement en ce qui concerne la lutte contre les maladies et les moyens thérapeutiques actuellement à notre disposition.

Les antibiotiques :

Le terme d'*antibiotique*, tel qu'on l'entend aujourd'hui, a été créé par Waksman (5), le père de *la Streptomycine* (1942). D'après lui *un*

antibiotique est une substance chimique élaborée par un microorganisme (champignon, bactérie, algue) qui possède la propriété de freiner ou d'inhiber le développement de bactéries ou d'autres microorganismes.

Ettlinger (6) donne une définition plus précise et plus générale : *Les antibiotiques sont des produits élaborés par des microorganismes ou d'autres cellules vivantes, possédant la propriété d'empêcher la croissance de microorganismes, et ceci à des dilutions très poussées.* L'élargissement de cette conception à « *d'autres cellules vivantes* » tient compte du fait que dans la nature chaque organisme est obligé de lutter pour son existence et pour son espace vital, et que la production de substances antibiotiques ne doit pas être réservée seulement aux êtres inférieurs des systèmes zoologiques et botaniques.

Cette conception est partagée par Duggar et Singleton (7) qui estiment que la définition du terme « *antibiotique* » doit être prise dans un sens très large *(very liberal)*. En ce qui concerne l'expression « *à des dilutions très poussées* », les opinions des auteurs diffèrent encore beaucoup; il s'agit là d'un problème conventionnel qui doit être réglé dans un proche avenir.

Parmi les milliers de produits antimicrobiens actuellement connus, il en est au maximum deux douzaines qui se prêtent à la thérapie anti-infectieuse humaine et animale. On trouvera dans la « *Antibiotika-Fibel* » de Walter et Heilmeyer (8) un tableau résumant les principaux antibiotiques employés en clinique.

Heseltine (9) donne un aperçu des antibiotiques anciens et modernes, employés en clinique, en insistant sur les propriétés de chacun de ces produits. Le petit nombre d'antibiotiques utilisables en clinique résulte des exigeances auxquelles ils doivent satisfaire pour être admis comme médicaments : toxicité aussi faible que possible; pouvoir sensibilisant faible ou inexistant dans le sens des principes de l'*allergie*; production d'un état de résistance nulle ou très lente surtout vis-à-vis des bactéries purulentes et du Bacille de Koch; action antivitaminique nulle ou très faible; élimination du danger d'infections secondaires bactériennes ou mycosiques.

Le critère essentiel *de chaque substance antibiotique et de chaque médicament chimiothérapique* est l'absence de toxicité, qui subordonne l'emploi de tous les médicaments. La production d'un état de résistance et l'apparition d'infections secondaires constituent actuellement des problèmes sérieux, surtout par l'emploi souvent trop généralisé et trop peu raisonné des antibiotiques qui fait déjà douter du bien-fondé de cette thérapie. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce problème.

Action antibactérienne des antibiotiques :

Comme les autres substances antibactériennes, les antibiotiques peuvent agir de deux façons : *bactériostase* ou *bactéricidie*.

La *bactériostase est un processus réversible*, puisque des rétrocultures sur nouveau milieu dépourvu d'antibiotique deviennent de nouveau positives. Inversement, *la bactéricidie est un processus irréversible*. Il faut retenir qu'une substance antibactérienne donnée n'est pas forcément bactériostatique ou bactéricide; sa façon d'agir dépend de plusieurs facteurs, dont les principaux sont : la concentration de l'antibiotique et l'état momentané des bactéries éprouvées.

Dans ses premiers essais de 1929 sur l'*action de la Pénicilline*, Fleming la considérait comme un antiseptique à action lente. Onze années plus tard, Florey et ses collaborateurs (10) ont repris l'étude de la *Pénicilline* et arrivent à des conclusions différentes. Ils n'ont pu constater qu'une action bactériostatique. Cette contradiction a ensuite été expliquée par Hobby (11) qui a pu prouver que *la Pénicilline* possède, même à de très faibles concentrations, une action bactéricide très prononcée sur des bactéries se trouvant en pleine croissance, tandis que des bactéries âgées, à vie ralentie, ne sont guère influencées par elle. Il faut en conclure que Fleming a travaillé surtout avec de *jeunes cultures très proliférantes*, tandis que Florey avait utilisé des *cultures âgées à multiplication très restreinte*.

Un autre phénomène a été également observé surtout chez *des Staphylocoques*. Après une prolifération préliminaire très active, la plupart de ces germes sont tués rapidement par *la Pénicilline :* cependant il subsiste toujours un minimum de survivants, dont la croissance reprend et, après 24 heures, le nombre de germes atteint sensiblement la valeur initiale. Ce phénomène a été étudié surtout par Bigger qui appelle ces bactéries résistantes « *persisters* »; celles-ci reprennent leur multiplication au moment où la concentration léthale de *la Pénicilline* n'est plus atteinte. Elles semblent donc aussi sensibles à *la Pénicilline* que la souche initiale et le phénomène de survivance semble dû à un amoindrissement du taux de *Pénicilline*.

Nous avons insisté sur ces deux phénomènes puisqu'on rencontre dans *la thérapie antituberculeuse* des manifestations semblables.

L'action des antibiotiques est de nature sélective, c'est-à-dire *qu'il y a une spécificité vis-à-vis des différents microorganismes*. Ainsi chaque antibiotique a son spectre d'action antimicrobienne propre, et l'on comprend ainsi que certains antibiotiques répondent à la définition des médicaments chimiothérapeutiques. On connaît encore mal les causes et les mécanismes d'action des antibiotiques. Ettlinger (12) arrive à la conclusion suivante : Les polypeptides basiques Tyrocidine, Subtiline et Polymyxine sont des *cytolytiques* comme les savons synthétiques, puisqu'ils agissent sur la tension osmotique des cellules bactériennes. Chez tous les autres antibiotiques, le mécanisme d'action est encore mal connu. *La Pénicilline* forme des combinaisons stables avec des récepteurs spécifiques des bactéries sensibles. Cette réaction engendre des troubles du métabolisme protidique et surtout des acides nucléiques. Les antibiotiques tels que *la Bacitracine*, *le Chloramphénicol*,

la Tétracycline et probablement aussi la Néomycine, agissent d'une façon similaire et sont *des substances frénatrices de la synthèse protéique*. L'action antibiotique de *la Streptomycine* est probablement due à un *blocage spécifique de la dégradation oxydative finale des hydrates de carbone*.

Dans le cadre de notre travail c'est surtout *l'antagonisme Champignon-Bactérie* qui nous intéresse, et nous tenons à donner un petit aperçu historique de ce problème.

Eberth a trouvé lors de ses études *en Egypte*, que dès la plus haute antiquité *les Arabes* et les peuplades *d'Afrique* avaient l'habitude de panser les plaies et les blessures à l'aide de *moisissures* prélevées sur les harnais de leurs bêtes de somme. Les paysans de *l'Europe Centrale* et même de nos campagnes, comme le dit Risler (13), ont l'habitude de conserver soigneusement *le pain de seigle moisi*. Mélangé à l'eau sous forme d'une pâte, on l'emploie comme pansement sur les blessures. Ce fait a été mentionné également par Keiff qui a appliqué cette thérapie dans un camp de concentration en Alsace, ainsi que par Mainguy (14) qui le signale dans la thérapie vétérinaire. En 1852, « *The Lancet* » signale pour la première fois l'utilisation des Levures dans le traitement de la *furonculose*. Pawlowsky (15) a observé en 1887 leur pouvoir inhibiteur au cours de l'évolution du *Charbon* et Heer (16) indique en 1888 les mêmes propriétés *des Levures* en ce qui concerne les *Bacilles d'Eberth* et les *Salmonella*. Boinet et Rœser (17) ont confirmé en 1890 l'action inhibitrice *des Levures* vis-à-vis du *Bacille typhique*, du *Bacille pyocyanique* et de la *Bactéridie charbonneuse*. La même année ces auteurs ont utilisé l'action des *Levures* contre le *muguet*. Gosio (18) a expérimenté des filtrats de culture purifiés de *Penicillium glaucum contre la pellagre* et Stoos (19) avait observé en 1893 l'antagonisme d'*Oidium albicans (Candida)* vis-à-vis des *Streptocoques* et des *Staphylocoques*.

En 1890, Gasperini (20) avait déjà constaté un fait expérimental plus important : « *Le Streptothrix se développe spontanément à la surface des bactériacées et des hyphomycètes* », grâce à la faculté que possèdent ses filaments de digérer ces organismes assez riches en azote.

Le travail le plus intéressant fut cependant effectué en 1896 par Duchène (21). Dans ses nombreuses expériences sur le *Penicillium glaucum*, il expose de manière magistrale les lois qui démontrent l'antagonisme des moisissures et des bactéries et ses observations fondamentales éclairent nettement ce problème :

« *On peut espérer qu'en poursuivant l'étude des faits de concurrence biologique entre moisissures et microbes, étude seulement ébauchée par nous et à laquelle nous n'avons d'autre prétention que d'avoir apporté ici une très modeste contribution, on arrivera peut-être à la découverte d'autres faits directement utiles et applicables à l'hygiène prophylactique et à la thérapeutique.* »

En 1908, Sturli (22), reprenant les travaux de Duchène, constate que des filtrats purifiés de culture de *Penicillium glaucum* sont capables

d'inhiber la croissance d'une culture de *Charbon* sur bouillon de Lœffler.

Entre 1903 et 1907, Rappin (23), en vue de découvrir un vaccin contre *la tuberculose*, tente de diminuer la virulence du *Bacille de Koch* par des bactéries, telles que *B. subtilis*, *B. amylobacter*, *B. megaterium*, mais aussi par des moisissures comme *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium glaucum et Mucor mucedo*. Il fait ses expériences par contact direct de ces germes avec *le Bacille de Koch*.

Presque en même temps, Vaudremer (24) montre que certaines moisissures sont capables d'atténuer la toxicité de *la Tuberculine* et que dans certaines conditions *l'Aspergillus fumigatus tue le Bacille de Koch*.

En 1910, Creuze (25) a eu l'idée de généraliser l'emploi de l'antagonisme microbien pour la production de vaccins non spécifiques. Il utilise les propriétés antagonistes de *l'Aspergillus niger, de Penicillium glaucum et de Rhizopus* sur des bactéries.

Enfin, de 1924 à 1931 Gratia et Dath (26) ont repris l'expérimentation sur *l'action lytique des Streptothrix vis-à-vis des Streptocoques, Pneumocoques, du Bacille diphtérique et du Bacille de la coqueluche*. Parallèlement, Gratia et Jaumain ont confirmé la même action sur le *Gonocoque*, puis Gratia, poursuivant ses expériences, a montré que *l'association des mycolysats et des bactériophages* aboutit à d'excellents résultats thérapeutiques dans les infections staphylococciques.

Cet exposé nous paraît suffisant pour démontrer l'action antagoniste entre *les champignons et les bactéries*, et le profit que l'on pourrait en tirer dans la thérapeutique anti-infectieuse. Pour de plus amples détails, nous renvoyons au travail de Waksman (27) qui constitue une très bonne mise à jour de cette question.

CHAPITRE II

PROBLÈMES SOULEVÉS PAR L'ANTIBIOTHÉRAPIE ET LA CHIMIOTHÉRAPIE

Le terme de « *chimiothérapie* » a été introduit voilà plus de 50 ans par Ehrlich à la suite des découvertes de Pasteur, Koch et Behring qui ont mis en évidence le rôle des bactéries comme agents infectieux et les réactions de défense de l'organisme parasité.

Nous croyons que, d'après la conception d'Ehrlich, *les antibiotiques* font autant partie des produits chimiothérapeutiques que *les sulfamides et les antiseptiques*. Dans ce sens, il faut être conscient non seulement de l'action des antibiotiques sur les microorganismes, mais également sur le macroorganisme infecté.

Effets secondaires des antibiotiques sur le macroorganisme :

Les différents médicaments antibiotiques agissent selon leur affinité spécifique pour un organe, des tissus ou des cellules et aussi selon leur dispersion sélective dans l'organisme.

Cependant ce traitement, qui doit toucher essentiellement l'agent infectieux, fait souvent apparaître des effets secondaires imputables au médicament par formation de lésions organiques irréversibles consécutives à la maladie, ou par l'absorption ou la résorption de substances toxiniques provenant de l'agent infectieux tué ou de la décomposition des tissus lésés.

Nous allons brièvement résumer les réactions secondaires les plus importantes et les plus fréquentes.

Réactions allergiques :

Elles résultent de l'interréaction entre l'*antibiotique et le macroorganisme ;* elles sont assez fréquentes (environ 8 % des individus traités par *les antibiotiques*). La forme de ces manifestations est assez variable, le plus souvent on signale des *réactions dermiques* (urticaire) ou des *inflammations séreuses ou eczémateuses*. On a cru pendant longtemps que ces réactions allergiques étaient imputables aux impuretés accompagnant *les antibiotiques*. Actuellement on sait que même des substances

très pures peuvent les engendrer. La réaction allergique se manifeste au moment où *l'antibiotique* forme une combinaison avec les protéines sériques et *il se forme de cette façon un antigène complet qui donne naissance à des anticorps spécifiques*. Les allergies dues aux *antibiotiques* sont d'habitude strictement spécifiques, de sorte que des individus allergisés par la *Streptomycine* ne réagissent pas à la *Dihydrostreptomycine*. p. ex.

Réaction de Jarisch-Herxheimer :

Il s'agit d'une sensibilisation spéciale produite par l'interaction de *l'antibiotique, du micro- et du macroorganisme*. Elle est due à *l'action bactéricide de l'antibiotique* qui a pour conséquence la libération d'une forte dose d'endotoxines, *lesquelles ne sont pas toxiques par elles-mêmes, mais le deviennent par association avec les protéines ou les polysaccharides du macroorganisme*, constituant de cette façon un allergène complet.

En somme, l'antibiotique produit la même action paradoxale que *le mercure et l'arsenic*, qui peuvent engendrer notoirement dans le traitement de la syphilis des symptomes d'hypersensibilité.

Toxicité des antibiotiques :

La plupart des *antibiotiques usuels* ont une toxicité très réduite si l'on ne dépasse pas les doses prescrites. Ce fait est surtout remarquable chez *la Pénicilline* et contraste avec ses effets secondaires allergiques. *Les lésions toxiques les plus graves sont produites par la Streptomycine :* on connaît son action sur le nerf auditif et les troubles de l'équilibre statique qui sont fortement dépendants des doses administrées. A un moment donné, on croyait avoir remédié à cet inconvénient par la découverte de la *Dihydrostreptomycine*, mais par la suite on s'est aperçu que cette dernière présentait les mêmes inconvénients, sinon plus graves. L'association *des Streptomycines* avec *l'Acide pantothénique* paraît, à ce sujet, recommandable.

La Bacitracine, la Néomycine et la Polymyxine ont un composant fortement toxique pour les reins ; c'est pour cette raison qu'on les emploie presque uniquement en usage externe.

Action antivitaminique des antibiotiques :

L'effet antivitaminique se manifeste surtout sur *la synthèse des vitamines* dans le tube digestif par son action nuisible sur la flore intestinale. Ce sont principalement *les vitamines du complexe B* qui sont touchées par une antibiothérapie prolongée.

Les symptômes d'hypovitaminose B qui sont le plus souvent produits par *les antibiotiques* à large spectre d'action, se manifestent par des *lésions inflammatoires cutanées et muqueuses*. D'autre part, on a noté des troubles beaucoup plus graves qui s'expliquent par le fait que *certaines*

vitamines du groupe B constituent des facteurs de croissance essentiels de nos bactéries symbiotes. La destruction de cette flore bactérienne normale peut donc se répercuter aussi bien sur les microorganismes utiles que sur le macroorganisme traité.

Les surinfections bactériennes et mycosiques consécutives à l'antibiothérapie:

La composition de *la flore microbienne normale* de l'homme se trouve toujours équilibrée. Le trouble de cet équilibre par la destruction ou l'élimination de certains composants à la suite de l'antibiothérapie peut permettre un envahissement par d'autres groupes bactériens avec des conséquences cliniques parfois fâcheuses. D'habitude l'équilibre microbien se rétablit rapidement après cessation de l'antibiothérapie. Dans certains cas cependant, on note des surinfections qui peuvent se manifester soit au niveau du tube digestif, soit dans l'appareil urinaire, soit encore dans les poumons. Actuellement on craint surtout des surinfections par certaines souches de *Staphylococcus pyogenes*. Ainsi, BERNHART (28) rapporte des cas de *surinfection staphylococcique* foudroyante et absolument réfractaire à tout traitement, se terminant d'habitude par la mort. Un autre genre de surinfection peut apparaître, *non pas par modification de la flore bactérienne, mais par un développement abondant de différents champignons*, parmi lesquels *Candida albicans*, qui se trouve normalement comme saprophyte dans l'appareil buccal et digestif, est le plus fréquent. Ces maladies, connues sous le nom de « *moniliases* » ou « *candidoses* », peuvent être considérées comme les infections les plus dangereuses de l'antibiothérapie et se terminent parfois par des issues fatales, comme ROSSIER et WEGMANN (29) les décrivent.

Résistance microbienne aux antibiotiques:

L'inconvénient essentiel de l'antibiothérapie réside dans l'apparition *d'une résistance des agents pathogènes à l'antibiotique employé.*

Pendant un temps plus ou moins long, les microorganismes pathogènes subissent les conséquences du traitement spécifique antibiotique. Cependant, ils s'adaptent peu à peu à *l'antibiotique* en modifiant leurs propriétés enzymatiques ou leurs métabolismes et luttent ainsi contre leur antagoniste avec les moyens les plus efficaces que peut posséder un être vivant. *Ils mobilisent leurs capacités génétiques et subissent une mutation faisant apparaître une nouvelle souche de bactéries insensibles à l'antibiotique.* On distingue aujourd'hui les « *one-step* » *mutations (Streptomycine)* et les « *multiple-steps* » *mutations (Pénicilline).*

Ces phénomènes de mutation trouvent leur preuve dans l'apparition de souches héréditairement résistantes. Ainsi, des *Bacilles tuberculeux*, par exemple, initialement *streptomycino-sensibles*, acquièrent au bout de 4 à 6 mois de traitement une résistance de 100 % *à l'antibiotique.* Celle-ci se maintient pendant de nombreuses générations cultivées dans des milieux dépourvus de *Streptomycine.*

La notion de résistance est aussi vieille que la chimiothérapie même. Ehrlich avait déjà observé ce phénomène et décrit ses principes essentiels qui sont de deux ordres :

— les bactéries doivent être à l'état de multiplication ;

— les bactéries doivent être en contact direct avec le médicament.

Le processus de l'apparition de la résistance évolue « *in vitro* » et « *in vivo* » en rapport direct avec *la vitesse de multiplication des bactéries ;* c'est pour cette raison que des bactéries à l'état de vie ralentie ne deviennent jamais résistantes, et des germes à multiplication rapide tels que les *Colibacilles* acquièrent plus rapidement la propriété de résistance, que *les Bacilles tuberculeux* à prolifération beaucoup plus lente. D'autre part, le phénomène de résistance se développe d'autant plus vite que le nombre de germes entrant en contact avec *l'antibiotique* est plus grand et que la concentration de *l'antibiotique* est plus faible.

Dans chaque prélèvement bactérien on trouve des variantes très sensibles et d'autres plus ou moins résistantes. Le pourcentage des germes hautement résistants est pour la plupart des bactéries de 10^{-6} à 10^{-8}. Chez les *Bacilles de Koch* et le *Coccobacille de Pfeiffer* ce pourcentage est encore plus faible, d'environ 10^{-10} à 10^{-11}, c'est-à-dire un germe résistant sur 100 milliards de germes sensibles.

Une souche homogène devenue résistante le reste en général héréditairement, même dans un milieu dépourvu de *l'antibiotique* en question.

La résistance acquise est presque toujours strictement spécifique, alors que le germe reste sensible à d'autres médicaments chimiothérapeutiques. Ce fait est surtout valable pour *les Bacilles tuberculeux* en ce qui concerne tous *les tuberculostatiques* actuellement connus. La spécificité de la résistance n'est valable que pour les produits chimiothérapeutiques à point d'attaque différent ; si ce dernier est propre à deux substances antibiotiques ou antiseptiques, on assiste au *phénomène de la résistance croisée.*

Le développement de la résistance est freiné par l'emploi de plusieurs médicaments chimiothérapiques à points d'attaque différents. Théoriquement, on peut s'expliquer ce fait facilement : Si dans une population microbienne, il se trouve 10^{-8} de germes résistants, l'emploi simultané de deux produits chimiothérapiques fait diminuer le nombre des germes à 10^{-16} résistant aux deux produits.

Principes servant à éviter les dangers de l'antibiothérapie :

Pour diminuer ces divers risques on applique actuellement une thérapie combinée qui a pour but :

1° la diminution de la toxicité des antibiotiques qui, associés, peuvent être administrés à doses plus faibles ;

2° De retarder ou d'empêcher l'installation du phénomène de résistance, étant donné qu'il est relativement difficile à un microorganisme

de lutter *contre deux antibiotiques* administrés à la fois, et ceci surtout par l'élaboration des enzymes d'adaptation.

3° D'élargir le spectre d'action antimicrobienne d'un côté par des propriétés additives et de l'autre par une action synergique.

Ce synergisme de la thérapie antibiotique associée a permis d'obtenir des résultats thérapeutiques dans des cas désespérés et constitue une des plus belles découvertes de la médecine moderne.

Il faut d'autre part prendre en considération les moyens de lutte dont dispose *le macroorganisme infecté* et que nous avons déjà mentionnés. Ainsi, la chimiothérapie doit tenir compte de l'état du terrain et de ses capacités de résistance à la maladie. *Il est certain que chaque fois que les moyens de défense autonomes du macroorganisme sont défaillants, toute chimio- et antibiothérapie est vouée à l'échec.*

CHAPITRE III

LA THÉRAPIE ANTITUBERCULEUSE MODERNE

L'emploi des antibiotiques et des médicaments chimiothérapeutiques en général dans le traitement de la tuberculose est basé sur les observations que *les Bacilles tuberculeux* sont freinés ou inhibés « *in vitro* » par les antibiotiques présents dans le milieu de culture. Il repose d'autre par sur les essais expérimentaux au moyen des animaux de laboratoire.

En général, on peut dire qu'on a pu prolonger la vie des animaux inoculés et prouver que les lésions pathologiques sont beaucoup moins étendues que chez les animaux témoins. On n'est cependant pas autorisé à parler d'une *guérison réelle*, puisque tous les animaux rendus tuberculeux et traités succombent finalement après cessation du traitement. Au cours des autopsies on trouve toujours des bactéries à vitalité et à virulence plus ou moins modifiées et ceci même chez les animaux dépourvus de toute lésion pathologique. On sait d'autre part qu'à l'inverse de la plupart des autres agents infectieux, *le Bacille tuberculeux* ne se multiplie pas seulement dans les humeurs, mais également dans le tissu interstitiel et surtout dans les macrophages. Ces bacilles endocellulaires ne peuvent être touchés que par des concentrations très fortes de médicaments *tuberculostatiques*, d'après Mackaness (30) ; ces taux sont alors nettement toxiques pour le macroorganisme même.

Jusqu'à présent nous ne possédons pas de médicament antituberculeux à *pouvoir bactéricide* suffisant et permettant une « *therapia magna sterilisans* ».

D'après les recherches expérimentales de Fust et ses collaborateurs (31) on risque, par la destruction brutale d'un grand nombre *de Bacilles tuberculeux*, l'envahissement massif par les endotoxines libérées qui, par des réactions secondaires, engendrent dans l'organisme sensibilisé une allergisation et des réactions du genre Jarisch-Herxheimer pouvant aboutir à une issue fatale par *choc anaphylactique*. Ceci est d'ailleurs confirmé également par *l'antibiothérapie massive dans les fièvres thyphoïdes*.

Les antibiotiques tuberculostatiques actuels ne permettent qu'un amoindrissement de la vitalité des bacilles dans l'organisme infecté qui, dans ces conditions, peut faire appel à tous ses moyens physiologiques de défense pour en profiter au maximum. Cependant, *l'antibiothérapie antituberculeuse* est de longue haleine, ce qui provoque les inconvénients que nous avons déjà cités.

Traitement tuberculeux et résistance antibiotique:

L'infection tuberculeuse se différencie nettement des autres infections courantes, fait qui a ses conséquences également dans l'emploi des produits chimiothérapiques et dans l'instauration de l'état de résistance. Nous allons énumérer les points essentiels de cette question.

Le Bacille de Koch a un pouvoir de prolifération relativement lent, ce qui se répercute sur l'instauration de la résistance. Ainsi, *les Colibacilles*, par exemple, peuvent acquérir une résistance définitive en quelques jours contre *la Streptomycine*, alors que *les Bacilles de Koch* demandent 2 à 3 mois pour y arriver.

L'intensité de multiplication *des Bacilles tuberculeux* est très variable dans les différents foyers. Il existe des lésions dans lesquelles le bacille ne se multiplie pas du tout, comme dans les foyers encapsulés ou calcifiés et dans les cavernes caséeuses peu ou pas du tout vascularisées. Ces germes latents *(persisters)* ne sont naturellement pas influençables et n'acquièrent par conséquent aucune résistance. S'ils sont véhiculés par hasard dans un autre tissu, où ils trouvent des conditions de vie favorables, ils se multiplient rapidement et on trouve alors dans l'organisme tuberculeux de nouveau des germes sensibles, malgré une antibiothérapie antérieure très longue.

D'autre part, on voit *surtout dans la phtisie caverneuse* des conditions exceptionnelles pour l'apparition de la résistance, puisqu'on y décèle un grand nombre de bactéries agglomérées sur un espace réduit et qui, par le manque d'irrigation, sont difficilement accessibles par l'antibiotique y arrivant à une concentration trop faible. On perçoit ainsi, comme Medlar et ses collaborateurs (32) l'ont montré, *l'instauration d'une résistance beaucoup plus tardive dans la tuberculose pulmonaire caverneuse que dans le processus purement exsudatif.*

Un autre fait, que nous avons déjà brièvement mentionné, a trait à *la phagocytose du Bacille tuberculeux par des macrophages*, qui les protègent contre les doses efficaces des antibiotiques spécifiques. Ces germes endocellulaires peuvent devenir résistants et occasionner des récidives.

Mesures dirigées contre l'instauration de la résistance:

En général, *les médicaments chimiothérapeutiques* ont un mécanisme d'action beaucoup plus compliqué que *les antiseptiques* proprement dits. Ils peuvent facilement perdre leur efficacité dans des cas de récidive; pour remédier à cela, il faut alors employer un médicament tout différent, ce qui est la raison pour laquelle on fait actuellement appel à *l'antibiothérapie spécifique associée*. Il existe aujourd'hui *trois tuberculostatiques majeurs : la Streptomycine, l'I.N.H. et le P.A.S.* D'après un travail de Crofton (33) les traitements combinés suivants se sont montrés

efficaces dans la thérapie antituberculeuse et reculent l'instauration de la résistance :

1° Association tri-antibiotique : *Streptomycine — Isoniazide — P.A.S.* : Beaucoup d'auteurs considèrent cette combinaison comme la plus efficace au point de vue thérapie et résistance.

2° Association bi-antibiotique : *Streptomycine — Isoniazide :* Cette combinaison semble actuellement la méthode de choix. *Streptomycine—P.A.S. :* Cette association est également favorable, mais semble inférieure à la précédente, surtout du fait de la meilleure tolérance de *l'Isoniazide.* La même objection peut être faite pour l'association *Isoniazide—P.A.S.*

3° Thérapie intermittante : Elle consiste en l'administration quotidienne d'un tuberculostatique, auquel on associe deux ou trois fois par semaine un autre antibiotique spécifique. Cette méthode a donné également de bons résultats et possède l'avantage de pouvoir employer un antibiotique essentiel, mais mal toléré, à des doses thérapeutiques.

4° Thérapie alternante : Elle comporte l'administration d'un tuberculostatique pendant un temps relativement long (une semaine ou un mois), puis son remplacement par un autre antibiotique spécifique pour la même durée. Cette méthode a donné des résultats beaucoup moins favorables que la thérapie associée; elle permet plus facilement l'instauration de la résistance *du Bacille tuberculeux.*

Effets secondaires des tuberculostatiques les plus importants:

Streptomycine :

Nous avons déjà mentionné le *composant neurotoxique* très dangereux de la *Streptomycine.* Keller et ses collaborateurs (34) ainsi que J. Meyer et ses collaborateurs (35) ont pu montrer que *cet antibiotique peut être détoxiqué par sa combinaison avec l'Acide pantothénique.* Il faut retenir encore que la résistance à la *Streptomycine* s'instaure relativement vite, puisqu'elle se produit par une seule mutation génétique (« *one-step mutation* ») comme Demerec (36) l'a prouvé.

Isoniazide :

Cet antibiotique est susceptible de produire des troubles sensoriels pouvant aboutir à une *polynévrite.* Le phénomène de résistance évolue « *in vitro* » et « *in vivo* » d'après les mêmes principes que pour la *Streptomycine.* Liebermeister (37) conclut par conséquent à une « *one-step mutation* ». L'I.N.H. a un avantage important par rapport à tous les autres tuberculostatiques, puisque d'après Mackaness et d'autres auteurs il peut facilement pénétrer à l'intérieur des cellules.

P. A. S. :

Cet antibiotique présente l'inconvénient de susciter assez souvent des *troubles gastro-intestinaux*. Cependant, l'instauration de la résistance évolue plus lentement et plus tardivement que pour les deux premiers, de sorte qu'on admet que le processus de mutation est celui des « *multiple-steps mutation* ».

Thiosemicarbazone :

Ici on peut craindre, en plus des troubles gastro-intestinaux, *des modifications de la formule hématologique et des organes hématopoïétiques.* Par contre, l'état de résistance apparaît plus lentement que chez les autres tuberculostatiques. Il faut de plus mentionner que les germes sensibles ne sont jamais définitivement inhibés, mais que leur croissance est seulement ralentie.

Viomycine :

Cet antibiotique produit les *mêmes réactions neurotoxiques* que *la Streptomycine*; elles peuvent également être amoindries par l'association avec l'Acide pantothénique. La résistance se développe relativement vite et se rapproche également du type *Streptomycine.*

Nous croyons avoir pu donner un aperçu général sur *la symbiose et l'antibiose, sur la thérapie antibiotique générale et spécifique et sur les inconvénients* qui s'y rattachent, permettant de comprendre le principe et le but de nos travaux personnels.

CHAPITRE IV

ADAPTATION ENZYMATIQUE

Le rôle fondamental des enzymes pour le méta- et le catabolisme des produits chimiques dans les cellules animales et végétales est indubitable aujourd'hui. Le rôle de ces ferments dans la synthèse et la dégradation des produits métaboliques est spécifique pour chaque espèce vivante et d'après les récents travaux de Frey-Wissling (38) ils sont en étroite relation avec la génétique et constituent un des facteurs héréditaires essentiels.

Dans les conditions normales, une cellule dispose d'une certaine gamme d'enzymes essentielles pour sa vie et qu'on appelle *les enzymes constitutives*. Il existe cependant *des ferments d'adaptation* que les cellules peuvent élaborer si on les oblige à vivre dans un milieu artificiel composé de substances qu'elles n'auraient pas pu utiliser initialement. Pour de plus amples renseignements en ce qui concerne cette *adaptation enzymatique*, nous renvoyons à Monod (39) et à Spiegelmann (40).

On attribue différents sens au terme « *adaptation* » en biologie. Monod et Cohn (41) l'emploient seulement *dans les cas où la modification du pouvoir enzymatique de la cellule est due à l'influence d'un substrat spécifique donné, et non pour les cas de mutation*. Ce phénomène doit donc être différencié de celui de la *sélection* qui apparaît chez des microorganismes, par exemple à la suite de *l'instauration de la résistance* à des médicaments et principalement des antibiotiques, processus que certains auteurs ont également appelé « *adaptation* ». Cohn et ses collaborateurs (42) proposent pour ce phénomène le terme d'« *induction* » à la place d'« *adaptation* ». On distingue ainsi les *enzymes constitutives et induites*, ou mieux, des *systèmes enzymatiques constitutifs et induits*. On parle donc également de substances inductrices *(inducers)*.

La formation d'*enzymes adaptives* a été observée seulement chez *les bactéries et chez les champignons* jusqu'à présent, mais on a de fortes raisons de croire qu'elles peuvent aussi être formées par des organismes supérieurs. La résistance augmentée que les animaux à sang chaud peuvent acquérir après une intoxication, ainsi que leur possibilité de former des anticorps, peuvent servir d'exemple dans cet ordre d'idées, comme Burnet et Fenner (43) le font ressortir. Ces ferments adaptifs apparaissent surtout chez *les bactéries et les champignons*, par exemple lors de la modification de leur virulence et de leur vitalité. *Dans ce cas, il peut s'agir d'enzymes nouvellement synthétisées ou de mutants appa-*

raissant par sélection génétique. Une modification *du génotype par mutation* produit très probablement des enzymes nouvelles seulement par la seconde génération, mais cette propriété reste alors acquise aux générations futures.

La propriété d'élaborer *une enzyme d'adaptation* est probablement due à la synthèse d'une protéine nouvelle enzymatiquement active; cette supposition semble, d'après nos connaissances actuelles, la plus plausible, bien qu'on ait essayé d'expliquer la formation *des enzymes d'adaptation* par d'autres possibilités, par exemple l'élaboration d'un cofacteur ou *coenzyme*, ou la modification de la perméabilité cellulaire.

Yudkin (44) a élaboré une théorie originale de cette *adaptation enzymatique en se basant sur la loi des masses.* Le raisonnement de cet auteur a servi à Mandelstam (45) comme point de départ d'une autre théorie que nous résumons très brièvement en renvoyant pour les détails à la publication originale :

La cellule vivante a à sa disposition un réservoir de matériaux élémentaires représentés par les multiples sources d'hydrates de carbone et d'azote, d'ions minéraux, de vitamines, etc. A partir de ces matériaux, la cellule synthétise ses substances protéiniques, polyhosidiques et enzymatiques idiogènes.

Les enzymes sont élaborées seulement à partir de *préferments.* Les protéines et ces préferments sont en équilibre avec le matériau constitutif initial. Les enzymes sont alors synthétisées par des réactions monomoléculaires réglées également par la loi des masses. L'équilibre entre les enzymes formées et les substrats nutritifs à leur disposition est également réglé par cette loi jusqu'à la formation définitive des protéines. Cette hypothèse de Mandelstam n'insiste pas sur la qualité de ces préferments, ni sur celle des enzymes synthétisées. L'auteur prend seulement en considération des *processus quantitatifs*, de sorte que, d'après sa théorie, *chaque enzyme pourrait être constitutive ou adaptive.* C'est seulement le déséquilibre de la loi des masses, provoqué par l'introduction d'un substrat donné, qui est responsable de l'apparition de l'enzyme constitutive ou adaptive.

Cette hypothèse a pour base quatre conditions préalables :

1° La cellule doit être capable d'élaborer chaque préferment à partir de son matériel nucléaire et cytologique.

2° Toutes ces réactions doivent être réglées par la loi des masses.

3° Il n'existe pas de différence qualitative entre les enzymes constitutives et adaptives.

4° L'équilibre entre le préferment et l'enzyme doit être plus orienté du côté de l'enzyme dans le cas des ferments constitutifs, alors qu'il est dirigé vers le préferment s'il s'agit d'enzymes adaptives.

Nous empruntons à Sandoz (46) un exemple pour expliquer le processus d'adaptation enzymatique :

Le glucoside essentiel de *Scilla maritima est la Scillarène A* formée par un aglucone composé d'un stéroïde et de chaînes glucidiques renfermant du rhamnose et du glucose. Dans la plante fraîche il existe une enzyme, *la Scillarénase*, qui dégrade le glucose formant la molécule terminale de la chaîne glucidique. Par contre, le rhamnose n'est pas touché; pour le déterminer on a dû faire appel à une souche de *Penicillium habituellement glucosolytique*, mais cultivée, dans le cas présent, sur un milieu artificiel ne contenant que du *rhamnose* comme source glucidique. *Le Penicillium en question a donc élaboré une enzyme nouvelle, dont il est habituellement dépourvu et cette enzyme d'adaptation a permis de dégrader sélectivement la molécule de rhamnose et de la séparer de l'aglucone.*

Cultures associées:

Deux faits doivent être relatés pour comprendre ce que l'on entend par culture associé :

1° Quand deux organismes vivent sur un même milieu, l'un peut se développer au détriment de l'autre, c'est ce que l'on appelle *l'antibiose.*

2° Une substance adaptive apparaît par l'introduction d'un élément d'induction dans le substrat normal; c'est ce qu'on appelle *le phénomène d'adaptation.*

Chaque fois que ces deux conditions se trouvent réalisées, dans un milieu ensemencé au moyen de deux organismes, l'un agit comme inducteur sur l'autre en produisant une substance adaptive par laquelle il détruit son concurrent. Cette technique, faisant appel à deux microorganismes dont l'un détruit l'autre, est désignée par le terme d'« *antagonisme provoqué* ».

L'idée de produire ainsi des substances à action spécifique n'est pas nouvelle. En 1924 déjà, Schiller (47) a attiré l'attention sur *l'antagonisme provoqué entre certains champignons et le Bacille de Koch*, si les deux organismes se trouvent en concurrence vitale sur un même milieu. Gratia a fait des constatations analogues à la même époque, lors de ses expériences bactériolytiques au moyen de *Streptothrix*. Les travaux de ces deux auteurs sont tombés dans l'oubli, puis ont été repris en 1939 par Dubos (48) qui a cultivé différents microorganismes sur un milieu additionné à plusieurs reprises de *Staphylocoques pathogènes*. Ces différents germes ont ainsi acquis la propriété de lyser les *Staphylocoques pathogènes*. C'est aussi Dubos qui a réussi pour la première fois à isoler et à purifier *une substance adaptive synthétisée* par l'antagonisme provoqué.

En 1945 Bustinza (49) a proposé une technique analogue pour préparer des substances antibiotiques actives *contre le Bacille tuberculeux*. En se basant sur ces théories, Risler et ses collaborateurs (50) ont entrepris des recherches *en exposant le Bacille tuberculeux à l'action de certains champignons en culture associée* et ont isolé des substances adap-

tives contre le *Bacille de Koch*. Ces auteurs ont surtout fait appel à *Aspergillus flavus* et *Aspergillus oryzae*. Stimulés par ces résultats favorables, ils ont étendu leurs investigations à *d'autres champignons* ensemencés en culture associée avec *le Bacille tuberculeux*.

En d'autres termes, on peut se demander si l'apparition ou l'exaltation des *enzymes d'adaptation et des enzymes dissimulées* est de règle lorsqu'on place deux microorganismes face à face. L'expérimentation de Risler a confirmé cette hypothèse en ce qui concerne *les moisissures* suivantes, ensemencées *sur voile de Bacille de Koch hautement virulent ou de Bacille tuberculeux de Courmont*, en employant comme substrat le milieu de cet auteur :

Aspergillus niger
Aspergillus effusus
Aspergillus ustus (Bainier)
Aspergillus glaucus
Aspergillus amstelodami
Aspergillus nidulans
Aspergillus parasiticus
Penicillium glaucum
Penicillium notatum
Penicillium chrysogenum
Rhizopus oryzae
Rhizopus nigricans
Actinomyces griseus

Pour d'autres moisissures, le résultat a été négatif, et l'auteur en conclut :

« *En réalité, il apparaît que l'antagonisme microbien est beaucoup plus une question de souche qu'une question d'espèce. Mais les souches peuvent être adaptées à l'élaboration de produits antagonistes par l'utilisation bien comprise de l'extraordinaire pouvoir de plasticité qui caractérise la plupart des moisissures.* »

Risler a pu montrer aussi que l'*enzyme adaptive* anti-BK n'est pas seulement formée par *Aspergillus flavus*, *A. oryzae ou tout autre champignon* apte en culture associée avec *le Bacille tuberculeux*, mais également dans un certain nombre d'autres conditions :

1° Lorsqu'on ensemence un prélèvement du champignon donné sur des cultures vivantes de *Bacille tuberculeux*. Cette méthode répond en somme aux conditions des cultures associées.

2° Lorsque le champignon est cultivé sur son milieu habituel, auquel on ajoute une suspension de *Bacilles tuberculeux* tués par autoclavage.

3° Lorsqu'on cultive le champignon sur une culture *de Bacilles tuberculeux avirulents* (par exemple B.C.G.).

4° Lorsqu'on introduit dans une culture habituelle de champignons des substances dérivant plus ou moins *des Bacilles tuberculeux*, telles que *la Tuberculine*, les acides gras isolées du B.K., etc.

Action spécifique des antibiotiques d'adaptation:

Toutes les *espèces cryptogamiques* précitées sont aptes à élaborer des produits antibiotiques plus ou moins actifs, et possédant un spectre antimicrobien plus ou moins large. Cependant, si on les cultive en association avec *le Bacille de Koch, ils acquièrent une action anti-B.K. très prononcée et en même temps leur propriété antibiotique contre d'autres bactéries diminue ou disparaît complètement.* Ce fait est très important, puisqu'il élimine un danger dans le traitement antituberculeux : la possibilité d'une surinfection due à la stimulation de la flore bactérienne normale.

En résumé, il faut retenir que *des cultures associées* permettent d'obtenir *des antibiotiques d'adaptation* qui, en ce qui concerne la tuberculose, possèdent une action spécifique anti-B.K. très prononcée et sont dépourvus d'effets secondaires, en particulier vis-à-vis des bactéries de la flore commensale normale. L'emploi de ces antibiotiques d'adaptation est cependant subordonné au contrôle de leur toxicité éventuelle sur le macroorganisme.

Glauser (51) a désigné *les substances antibiotiques* qu'il a préparées d'une façon analogue sous le terme d'« *antibiotiques dirigées* ». Cet auteur a principalement utilisé des souches saprophytes telles que *le Bacille subtilis* et différentes espèces *de moisissures (Penicillium)* en culture associée avec diverses bactéries pathogènes. Des antibiotiques de ce genre, que nous désignons par le terme d'« *antibiotiques d'adaptation* », sont déjà employés actuellement en clinique et se trouvent dans le commerce pharmaceutique. C'est ainsi qu'il existe des *Anti-Staphylocoques, -Streptocoques, -Entérocoques, -Pneumocoques, - Pseudomonas, -Proteus, -Salmonella et -Shigella.*

En conclusion, nous citons Vargues et Grenier (52) : « *La grande majorité des biologistes admet l'hypothèse du chercheur soviétique* Oparine, *selon laquelle la synthèse chimique des molécules protéiniques a précédé la synthèse biologique. Par conséquent, les premiers êtres vivants ont été des hétérotrophes, des saprophytes, sans doute pas tellement éloignés des bactéries que nous cultivons dans nos milieux peptonés. Une fois ces premiers êtres apparus, « l'imagination » qui semble inhérente à la « vie » s'est mise à jouer, soit en inventant brusquement de nouvelles formes (mutations) soit en s'adaptant aux modifications du milieu (adaptation) ; par la suite, la sélection impose ses lois écologiques aux formes vivantes et crée les biotopes, les symbioses, les cénobioses, ou rejette dans la mort les inadaptés.* »

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE V

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION D'ASPERGILLUS AMSTELODAMI

Ce champignon a été isolé sur des cultures de Bacille de Koch devenues impures. Ce phénomène a été observé depuis de nombreuses années par J. Meyer; en effet, des cultures de Bacille tuberculeux sur milieu de Lœwenstein ou sur milieu de jus de pommes de terre glycériné, s'infectent très souvent après quelque temps de séjour à l'étuve et l'agent infectant est toujours le même champignon.

C'est à partir d'une telle culture que nous avons isolé l'Aspergillus que nous avons étudié et dont la détermination a été contrôlée par le « *Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn* » (Pays-Bas).

Aspergillus amstelodami fait partie du groupe *d'Aspergillus glaucus* d'après Thom et Raper (53). Ce groupe se caractérise par les propriétés suivantes :

Généralement présence de périthèces jaunes, sphériques ou légèrement ovalaires, à enveloppe mince, prises dans un enchevêtrement d'hyphes rouges et jaunes.

Les asques sont à 8 spores non groupées murissant habituellement en 2 à 4 semaines. Les ascospores sont lenticulaires, lisses ou rugueux, montrant généralement un sillon équatorial à bords frangés, crêtes larges régulières ou irrégulières.

Ampoules conidiophores plus ou moins abondantes, à rayons plus ou moins marqués. Conidiophores lisses, terminés par des vésicules.

Une série de stérigmates plutôt grossiers. Conidies elliptiques ou ovalaires toujours typiquement rugueuses.

Au point de vue général, nous tenons à mentionner que Langeron avait subdivisé ce genre en quatre sous-genres :

Aspergillus : un rang de stérigmates, périthèces absents;

Eurotium : un rang de stérigmates, périthèces présents;

Sterigmatocystis : deux rangs de stérigmates, périthèces absents;
Diplostephanus : deux rangs de stérigmates, périthèces présents.

Thom et Raper ne retiennent plus cette discrimination et rangent toutes ces formes, en raison de leur parenté et de l'intrication des caractères, dans le seul genre *Aspergillus*.

Pour plus de détails au sujet dès généralités sur les Aspergillacées, et principalement sur le groupe *Aspergillus glaucus*, nous renvoyons à ces deux auteurs.

Nous tenons à donner la clé de détermination de ce groupe qui est basée surtout sur les périthèces et les ascospores :

I. Périthèces présents:

A. — Ascospores lenticulaires ne dépassant pas 6 μ.

1° Ascospores à faces convexes lisses (ou à peu près).

a) Arêtes équatoriales absentes ou ne subsistant qu'à l'état de trace : *Série des Aspergillus repens.*

b) Arêtes équatoriales larges et arrondies, sillon large et peu marqué : *Série Aspergillus ruber.*

c) Arêtes équatoriales fines et ondulées, sillon profond en gorge de poulie : *Série Aspergillus chevallieri.*

2° Ascospores à faces convexes rugueuses : *Série des Aspergillus amstelodami.*

B. — Ascospores lenticulaires plus longues que 6 μ :

Espèces à grandes spores ou *série des Aspergillus (Eurotium) herbariorum.*

II. Périthèces absents:

A. — Colonies le plus souvent de teinte jaune-orangé, virant au brun :

1° Appareil asexué ressemblant à celui d'A. repens : *Aspergillus argilaceus.*

2° Appareil asexué proliférant surmonté souvent par des appareils secondaires : *Aspergillus proliferans.*

B. — Colonies vert foncé virant au bleu-verdâtre :

1° Appareil asexué réduit, velouté, avec conidiophores courts et abondantes chaînes de conidies : *Série des Aspergillus restrictus.*

2° Appareil asexué touffu, floconneux, avec de longs conidiophores, globuleux : *Série des Aspergillus itaconicus.*

Thom et Raper indiquent les caractères suivantes pour la série des *Aspergillus amstelodami* : « Ascospores mesurant 4,6 à 5 μ sur 3,6 à 3,8 μ, lenticulaires, incolores, avec sillon équatorial apparent creusé en V large et bordé d'arêtes irrégulières, à parois irrégulières ridées ou rugueuses sur toute la surface. »

Dans cette série se trouvent des souches qui diffèrent grandement par l'aspect de leurs colonies ; pourtant, leur point commun consiste en une similitude de taille et du type de leurs ascospores, puis par la coloration vert-olive foncé de leurs formes conidiennes, par la pigmentation d'un jaune éclatant des périthèces, et l'absence de pigment rouge à la surface des colonies et sur le côté inférieur.

La clé suivante montre les variations qui peuvent survenir dans ces séries et qui permettent de séparer les souches ou groupes de souches qui sont différentes au point de vue culture :

A. — **Colonies essentiellement à périthèces :**

1° Formes conidiennes abondantes au centre, et souvent dans les zones concentriques : *A. amstelodami* (Mangin, Thom et Church).

2° Formes conidiennes très disséminées ou absentes : N.R.R.L. n° 113 (N.R.R.L. = Northern Regional Research Laboratory).

B. — **Colonies essentiellement à conidies :**

1° Périthèces très disséminés et superficiels : N.R.R.L. n° 111.

2° Périthèces abondants en couches pliées au-dessus du mycélium conidiophore : *A. montevidensis.*

C. — **Colonies très chétives, périthèces et mycélium conidiophore très disséminé :** N.R.R.L. n° 110.

Après ces généralités, nous donnons la description de *l'Aspergillus amstelodami*. Cette moisissure a encore les synonymes suivants : Eurotium amstelodami, décrit par Mangin (54), Eurotium repens, var. amstelodami, étudié par Vuillemin (55).

Cultivé sur *milieu de Czapek modifié à* 3 % *de sucre*, cet Aspergillus donne de petits colonies de 4 à 6 cm de diamètre, homogènes ou finement plissées, duveteuses, à périthèces jaune à jaunes grisâtre terne mêlés à des hyphes stériles ou développant des appareils conidiens; la face inférieure est incolore virant au brunâtre avec l'âge.

Sur *milieu de Czapek gélosé à* 20 % *de sucre*, les colonies sont plus étendues, mesurant 8 à 10 cm de diamètre, plus ou moins plissées et à

zones concentriques. Les périthèces sont très abondants et inclus dans une masse mycélienne formant un épais tapis à la surface du milieu : à ce stade la pigmentation est d'un jaune éclatant, donnant une apparence caractéristique à la colonie ; les appareils sporifères asexués sont vert-olive, abondants dans le centre de la colonie et plus ou moins irrégulièrement disséminés sur toute la surface, masquant parfois la couche de périthèces qui se trouve en dessous. La face inférieure des colonies est jaune sous les couches de périthèces et plus ou moins verdâtre là où les formes conidiennes prédominent.

Les périthèces sont sphériques ou ovalaires, mesurant entre 115 et 140 μ et ne dépassant que rarement 160 μ de diamètre, non couverts d'hyphes ou enfouis dans un mycélium stérile. Les asques ont d'habitude 10 à 12 μ de long et sont munis de 8 spores. Les ascospores sont lenticulaires, mesurant 4,7 à 5,0 μ sur 3,6 à 3,8 μ. Elles sont munies d'un sillon équatorial très marqué en forme de V à parois irrégulièrement ridées et couvertes sur toute leur surface par des rugosités. Les ampoules conidiophores portent des chaînes radiées de conidies ; elles mesurent d'habitude de 30 à 50 μ de diamètre et sont parfois plus grandes. Les conidiophores sont incolores ou jaune verdâtre pâle. Ils mesurent 275 à 350 μ de long, et 10 à 12 μ de diamètre vers l'ampoule conidiophore : celle-ci est ovalaire et mesure 18 à 26 μ de diamètre. Les stérigmates ont 5 à 6,5 μ sur 2,5 à 3,5 μ ; les conidies sont finement épineuses, ovalaires, de taille variable, mesurant de 3,5 à 5,2 μ, mais le plus souvent autour de 4 μ de long.

Sur les cultures en présence du Bacille tuberculeux, nous avons aussi pu remarquer des chlamydospores isolées ou en chaînes terminales ou intercalaires, mesurant de 6 à 13 μ sur 9 à 15 μ.

Mentionnons pour terminer que ce champignon a été isolé à partir de *mycoses spléniques* décrites par E. Weill, Chevalier et Flandin, question qui a été assez controversée en ce qui concerne *la pathogénéité réelle du champignon.*

Nous donnons ci-après huit photographies illustrant mieux que toute description l'aspect cultural et microscopique de notre Aspergillus isolé à partir de colonies surinfectées de Bacilles de Koch.

Le grossissement des microphotographies est de 1 × 330 à 1 × 380. Nous tenons à remercier Monsieur Hirtz, Docteur en pharmacie, qui a bien voulu nous effectuer ces photographies.

CHAPITRE VI

PRÉPARATION D'UN ANTITUBERCULEUX D'ADAPTATION

Essais préliminaires :

Avant d'exposer nos recherches proprement dites, nous tenons à rapporter quelques essais préliminaires que nous avons effectués pour contrôler les données trouvées dans la littérature spécialisée, concernant la formation d'antibiotiques d'adaptation par les cultures associées.

Nous avons introduit dans 10 cc de milieu de jus de pomme de terre glycériné glucosé une öse d'une culture homogène de Bacille de Koch, souche 81 868 Collection Lister. On dispose à l'étuve à 37° pendant 6 à 8 jours, jusqu'à apparition d'un trouble produit par l'amorcement de la culture du B.K. A ce moment, on introduit une öse d'une suspension diluées d'*Aspergillus amstelodami* isolé par nous. On dispose à 27° et on note après 2 jours le développement d'un voile mycélien à la surface du milieu. En même temps, nous avons observé que le milieu s'éclaircit au-dessous de ce voile jusqu'à une profondeur de 2 cm.

Nous avons effectué une seconde expérience en ensemençant simultanément sur jus de pomme de terre glycériné glucosé quelques öses d'une suspension de B.K. et une öse d'une suspension diluée de notre Aspergillus. On dispose à 37°; la culture mycélienne commence à se développer à la surface du milieu après le 2e jour, mais le substrat reste indéfiniment limpide.

Une troisième expérience consistait à filtrer à travers un ultrafiltre Iéna 3 G 5 des milieux de culture associée; l'ultrafiltrat est ensuite ensemencé avec une suspension dense de B.K., on dispose à 37°. Nous n'avons pu observer aucun développement. D'autre part, 10 cc d'ultrafiltrat ont été introduits dans 90 cc de jus de pomme de terre glycériné glucosé frais et également ensemencés avec la souche de B.K. Le résultat était aussi négatif.

En conclusion, *on peut dire que notre Aspergillus amstelodami doit synthétiser un antibiotique d'adaptation à propriétés bactériolytiques.* L'expérience n° 3 prouve que l'antituberculeux d'adaptation est hydrosoluble et diffuse dans le milieu aqueux ambiant.

Préparation du milieu de culture de base:

Pour tous nos essais, nous avons eu recours au milieu de jus de pomme de terre glycériné glucosé, comme nous l'avons déjà mentionné. Ce milieu est préparé de la façon suivante :

Des pommes de terre pelées et découpées en fragments sont mises à bouillir dans deux parties d'eau. Maintenir l'ébullition jusqu'à ce que les pommes de terre soient cuites. Faire macérer encore 3 à 4 heures à froid, filtrer sur toile et ajouter au filtrat la quantité d'eau nécessaire pour ramener aux deux parties d'eau du départ.

Préparer d'autre part un bouillon glycériné glucosé de composition suivante :

Eau	1 000,0 cc
Glycérine	60,0 g
Glucose	20,0 g
Peptone	20,0 g
Extrait de viande Liebig	5,0 g
Glycérophosphate de potasse	1,0 g
Chlorure de sodium	1,0 g
Sulfate de magnesium ($MgSO_4$ 7 H_2O)	0,5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,1 g

Mélanger le jus de pomme de terre et le bouillon glycériné à parties égales. Ajuster à pH = 7,0. Chauffer à l'autoclave à 120° pendant 5 minutes. Nous avons filtré le milieu et nous répartissons à raison de 100 cc dans des boîtes de Roux, puis on stérilise. On ensemence ensuite avec une suspension de Bacille de Koch souche 81 868 et on dispose à 37°.

On observe le développement des cultures que l'on utilise après deux à trois semaines de séjour à l'étuve.

Une partie des boîtes de Roux est ensuite stérilisée à l'autoclave à 115° pour tuer les Bacilles de Koch; l'autre série est employée à l'état frais.

A ce moment, nous avons ensemencé les deux séries au moyen de notre souche d'*Aspergillus amstelodami (Mangin, Thom et Church)* et le tout est replacé à l'étuve à 37°. Notons que la souche d'Aspergillus que nous avons isolée a été déterminée par le « *Centraalbureau voor Schimmelcultures* » de Baarn (Bas-Bas) auquel nous exprimons ici nos plus vifs remerciements.

Après 8 à 10 jours notre champignon a atteint sa sporulation maximale qui est caractérisée par une pigmentation d'un jaune lumineux du voile homogène qui s'est formé à la surface du milieu. A partir de ce moment, le voile commence à changer d'aspect et prend une teinte gris-verdâtre.

D'après Risler, le taux d'antibiotique d'adaptation est le plus élevé à cette époque.

Extraction de l'antibiotique d'adaptation:

Celle-ci est effectuée selon la technique de Piettre (56) modifiée par nous. On sépare le mycélium du milieu liquide par centrifugation et filtration à travers du papier Chardin. Le filtrat, ramené à environ 100 cc pour chaque boîte de Roux, est disposé au réfrigérateur à + 4°. On prépare d'autre part un mélange à parties égales d'alcool et d'acétone que l'on refroidit également à + 4°; on réunit 100 cc de filtrat à 250 cc de ce réactif et l'on dispose encore pendant 12 heures au réfrigérateur. On obtient un précipité que l'on sépare par centrifugation pour rejeter le filtrat surnageant. Le précipité est encore lavé deux fois avec le mélange alcool-acétone, toujours refroidi à + 4°.

Pour éliminer des substances lipidiques provenant soit de l'extrait de viande, soit de la culture même, nous avons épuisé le précipité par l'éther. Le précipité purifié ainsi obtenu est dissous dans 100 cc de la *solution tampon au Véronal* de pH = 8,0 de composition :

Solution A : Véronal sodique à 0,1 mol (20,62 g °/₀₀).
Solution B : HCl N/10.

Pour préparer le tampon de pH = 8,0 on mélange :

Solution A	71,60 cc
Solution B	28,40 cc

Notons que toutes les solutions tampon que nous mentionnons ont été préparées d'après Kolthoff (57).

Le précipité en solution tampon est ramené à 200 cc au moyen d'eau distillée, puis on y introduit une solution aqueuse à 1 % de *Protamine Roche;* pour éviter autant que possible un excès de Protamine, nous l'avons ajoutée tout d'abord à 50 cc de la solution, goutte à goutte, jusqu'à ce que l'opacité reste stable. Nous connaissions ainsi la quantité de Protamine nécessaire et suffisante à ajouter aux 200 cc de la solution en expérience. En général, la purification nécessitait 20 cc de la solution à 1 % de Protamine pour 200 cc de solution. On dispose alors pendant 12 heures au réfrigérateur. On décante avec précaution et le liquide décanté est encore centrifugé pour éliminer les dernières traces du précipité. La solution limpide ainsi obtenue, qui contient l'antibiotique, est ramenée à pH = 5,6 au moyen d'un tampon phosphaté de composition suivante :

Solution A : Phosphate monopotassique à 1/15 mol (9,078 g °/₀₀)
Solution B : Phosphate disodique à 1/15 mol (11,786 g °/₀₀).

Pour obtenir la solution tampon de pH = 5,6, on mélange :

Solution A	95,0 cc
Solution B	5,0 cc

On ajoute à la solution acidifiée de l'alcool éthylique jusqu'à une concentration finale de 20 %. La substance antibiotique précipite de nouveau. On centrifuge à 6 000 t mn pendant 10 minutes, on décante pour obtenir un précipité que l'on reprend dans 20 cc de solution tampon au Véronal de pH 8.0. Cette solution est stérilisée par ultrafiltration à travers le filtre 3 G 5, on la recueille dans de petits flacons (genre Pénicilline) stériles. Nous avons ensuite procédé à la lyophilisation.

Le rendement a été d'environ 10 mg de substance antibiotique pour 100 cc de milieu initial, compte tenu du Véronal sodique contenu dans les 20 cc de solution tampon employés. Le précipité lyophilisé pesait 303 à 306 mg, dont 295 mg de Véronal sodique.

A titre comparatif, notons qu'au début de la fabrication de la Pénicilline, on obtenait un rendement d'environ 3000 unités pour 100 cc de milieu nutritif, ce qui correspond sensiblement à 2 mg de produit antibiotique, calculé en *benzoyl-pénicilline* A. Nous voyons ainsi que notre rendement peut être considéré comme satisfaisant, mais nous sommes conscient que notre produit ne constitue pas l'antibiotique chimiquement pur.

Nous avons effectué des dosages biologiques de nos deux antibiotiques d'adaptation *provenant de bacilles de Koch vivants et tués* et avons ainsi constaté que le pouvoir antibiotique vis-à-vis du Bacille de Koch est analogue pour les deux préparations. C'est pour cette raison qu'ultérieurement, nous n'avons plus fait appel qu'à *des cultures de B.K. tués*, afin d'éviter les dangers d'infection. Nous reviendrons sur ces dosages biologiques plus loin.

Technique modifiée:

Nous avons élaboré une technique de purification simplifiée et plus rapide. Tout d'abord il nous semblait important de simplifier le milieu de culture. En effet, en employant un milieu synthétique et de constitution moins compliquée on peut éviter certains inconvénients. Ce sont surtout les milieux à base de protéines et de peptone qui rendent la purification de l'antibiotique difficile; il nous a donc semblé indiqué de recourir à un milieu de Czapek-Dox :

Glucose	40,0 g
Nitrate de sodium	3,0 g
Phosphate monopotassique	1,0 g
Chlorure de potassium	0,5 g
Sulfate de magnesium	0,5 g
Sulfate ferreux	0,01 g
Lactate d'ammonium	5,0 g
Eau q.s.p.	1 000,0 cc

Mettre en solution et ajuster à pH = 7,0.

Les manipulations de purification sont ensuite les mêmes que précédemment, c'est-à-dire : stérilisation du milieu dans les boîtes de Roux; ensemencement par la souche de B.K. et culture de 2 à 3 semaines; stérilisation; ensemencement de l'Aspergillus amstelodami; séparation du milieu liquide cultivé par ultrafiltration.

Extraction de l'antibiotique:

Le filtrat de 100 cc de culture ainsi obtenu présentait un pH de 4,8. On le ramène à pH = 5,6 au moyen de NaOH 2 N et on redroidit à + 4°, puis on procède à la purification comme précédemment. La seconde phase de précipitation au moyen d'alcool est effectuée à une concentration de 30 %, ce qui amène une précipitation quantitative. Le précipité est encore repris dans 20 cc de tampon phosphaté à pH = 8,0; ce tampon est physiologiquement préférable au tampon de Véronal sodique. On le prépare en mélangeant :

Solution A	5,5 cc
Solution B	94,5 cc

Finalement, on passe à l'ultrafiltration et à la lyophilisation.

Au moyen de cette technique modifiée, nous avons eu un rendement de 245 mg de produit lyophilisé, dont 235 mg de phosphate. *Le rendement est donc de* 10 *mg de substance antibiotique.*

Nous avons préparé des cultures en grandes séries, pour obtenir du matériel pour une purification plus poussée. Nous avons déterminé les propriétés chimiques de nos deux préparations. Pour les essais « *in vitro* » nous avons utilisé le produit de la première purification. Auparavant nous avons déterminé les propriétés physico-chimiques des deux produits.

CHAPITRE VII

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ANTITUBERCULEUX D'ADAPTATION

Avant de commencer nos recherches physico-chimiques proprement dites, nous avons été obligé d'entreprendre quelques essais préliminaires d'orientation.

Aspect microscopique:

Le précipité hautement purifié se présente sous forme de cristaux plats ou en arêtes, jaunâtres, assez hygroscopiques; il est très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool à 90°, le méthanol et l'acétone, insoluble dans l'alcool absolu et dans tous les autres solvants organiques.

L'antibiotique présente une fluorescence verte aux rayons ultra-violets, sans spectre d'absorption.

Réactions chimiques:

L'analyse élémentaire a permis de déceler les quatre éléments C-H-O-N. Les réactions pour rechercher des groupes réducteurs (sucres) ont été effectuées d'après Benedict et Mollish et ont donné un résultat négatif. Les substances azotées ont été recherchées par les réactions au Biuret, à la Ninhydrine et au réactif de Sakaguchi. Toutes étaient positives.

Toutes ces recherches nous ont donné des indications utiles; c'est surtout la réaction spécifique de Sakaguchi, qui permet de supposer que nous avons à faire à un polypeptide conforme aux conceptions actuelles sur les ferments d'adaptation. Nous avons pu montrer que notre antibiotique d'adaptation a un pouvoir cytolytique sur *le Bacille de Koch.* Ettlinger a obtenu des résultats semblables dans son travail sur des antibiotiques à constitution polypeptidique, tels que la Polymyxine et la Tyrocidine. Il en est de même pour la Viomycine, la Bacitracine A et la Gramicidine S.

En connaissance de cause, nous avons orienté nos recherches vers la détermination les acides aminés pouvant faire partie de la molécule de notre antibiotique. A ce sujet, nous avons eu recours à la chromato-

graphie sur papier. Pour ce faire, il faut tout d'abord procéder à une hydrolyse, permettant de séparer la fonction peptidique — CONH — de la molécule protéinique. On traite 50 mg de substance par 0,5 cc d'HCl 6 N (environ 20 %) dans un tube scellé pendant 20 heures à 100°. Après ce temps, on ouvre le tube, on vide le contenu dans une cupule de porcelaine, on évapore à siccité. Pour éliminer l'acide chlorhydrique, on reprend le résidu sec à 2 reprises par 2 cc d'eau et on évapore chaque fois. Finalement, on dissout l'hydrolysat dans 2,5 cc d'eau, de sorte qu'on obtient pour la chromatographie une solution de 2 % environ.

Chromatographie sur papier:

Avant l'analyse proprement dite, nous avons effectué quelques recherches sur les solvants entrant en ligne de compte. Il importe de travailler avec des solvants ayant un effet de séparation favorable et net. Pour ces raisons, nous avons choisi les solvants suivants : Phénol/Eau = 8/2; n-Butanol/Acide acétique crist./Eau = 4/1/1; Isopropanol/Ammoniaque à 25 %/Eau = 80/2/18.

Le solvant Phénol/Eau donne un anneau de séparation plus large et plus flou, mais c'est malgré tout le solvant le plus propice. Les deux autres donnent une ligne de séparation plus nette et le mélange à l'isopropanol nous semble très recommandable, malgré sa migration un peu lente. Par contre, les solvants Méthanol/Ammoniaque à 25 % Eau = 90/2/8 et Pyridine/Acide acétique crist./Eau = 50/35/15 ne nous ont pas donné satisfaction. D'autres solvants, tels que la *Collidine*, *la Lutidine et l'α-Picoline*, sont très chers; c'est pourquoi nous y avons renoncé.

Nous avons eu recours à la chromatographie ascendante, qui nous a permis d'isoler tous les acides aminés mis en expérience. La chromatographie est effectuée dans une grande cloche en verre à bord rodé, disposée sur une plaque de verre rodé. On sature l'atmosphère de la cloche avec le solvant choisi pendant au moins 12 heures avant l'expérience. Nous avons employé le papier Whatman n° 1; une feuille (46 × 57 cm) est coupée en quatre, de sorte que nous avons utilisé pour nos chromatographies des rectangles de 28,5 × 23 cm. Après y avoir étalé l'hydrolysat, on enroule la feuille en cylindre et on la dispose pendant 6 heures dans l'atmosphère saturée sous la cloche.

Nous avons eu recours à la chromatographie dite bidimensionnelle. Le point de départ se trouve dans le coin gauche, à une distance de 2 cm des deux bords.

D'après nos résultats préliminaires, nous avons constaté qu'il fallait envisager la présence d'au moins 10 amino-acides; nous avons donc étalé à l'aide d'une micropipette 10 mm^3 de notre solution d'hydrolysat, correspondant à environ 20 γ pour chaque composant.

Le phénol à employer doit être préalablement purifié: à ce sujet, nous avons eu recours à la distillation sous vide en présence de poudre de zinc. Le solvant a la composition suivante :

Phénol	80 cc
Eau distillée	20 cc

Le phénol est liquéfié par chauffage léger et mélangé avec l'eau fraîchement bouillie et refroidie. Par addition de cyanure de sodium à 0,1 $^{0}/_{00}$, on évite l'auto-oxydation du phénol. Le mélange ainsi préparé se conserve au moins pendant un mois dans une bouteille hermétiquement close et placée à l'obscurité.

Le temps de migration est pour la distance la plus longue (25 à 26 cm) de 16 à 18 heures et pour l'autre (19 à 20 cm) de 12 heures.

La solution de Butanol/Acide acétique/Eau (40/10/10 cc) est assez stable et moins influencée par les variations de température que le mélange souvent indiqué à 4, 1/5. Le Butanol et l'acide acétique subissent après quelques semaines une estérification, ce qui restreint le temps de conservation du solvant. On doit donc de préférence travailler avec un mélange préparé au moment du besoin.

Le temps de migration pour la distance la plus longue est de 11 à 12 heures, et pour l'autre distance de 8 heures.

Le solvant Isopropanol/Ammoniaque/Eau (80/2/18) doit être fraîchement préparé, vu la volatilisation facile de l'ammoniaque. Le temps de migration pour la plus longue distance est de 18 à 20 heures.

Séchage et développement du chromatogramme :

Dès que la zone de migration du solvant est arrivé à peu près à 1 cm du bord supérieur du papier, on interrompt l'expérience, on retire le chromatogramme de la cloche et on sèche à l'étuve entre 60 et 70°. Étant donné que nous avons employé la technique bidimensionnelle, on ne doit pas dépasser ces températures pour éviter une modification des acides aminés. Pour cette raison et parce que le phénol forme facilement des « *barrières* », nous avons toujours employé dans le premier temps pour le côté long, soit l'isopropanol soit le butanol. Ces deux solvants s'évaporent très rapidement à ces températures. Pour la deuxième phase, nous avons alors utilisé le phénol qui est éliminé à l'étuve entre 100 et 110°.

Avant de procéder au développement, le chromatogramme est chauffé à l'étuve à 100° pendant 20 minutes, ce qui a pour effet de rendre les taches d'acides aminés reconnaissables à la lumière ultra-violette par leur fluorescence bleue.

Comme réactif révélateur nous avons employé une solution de Ninhydrine à 0,2 % dans le butanol, additionnée de 5 % d'une solution 2 N d'acide acétique.

Les chromatogrammes ainsi développés sont disposés à l'étuve à 105° et les taches d'acides aminés se révèlent en violet ou en jaune; elles ne restent stables que quelques jours, mais la coloration à la Ninhydrine peut être fixée par vaporisation avec une solution à 1 % d'un sel métallique bivalent tel que le sulfate de cadmium dissous dans le méthanol. La teinte des taches vire légèrement vers le rouge de ce fait.

L'interprétation de nos résultats a eu lieu par la détermination des valeurs Rf et par l'emploi simultané de chromatogrammes-test effectués avec des amino-acides connus, ce qui nous a permis de constater que nos valeurs Rf avec l'isopropanol et le phénol se rapprochaient à peu près de celles de CRAMER (58). Les valeurs phénoliques concordaient très bien, de sorte que les différences ne dépassaient pas ± 0,03. Par contre, celles que nous avons obtenues avec l'isopropanol montraient des différences un peu plus fortes et celles obtenues avec le butanol étaient en général nettement plus petites que les valeurs indiquées par CRAMER, ce que SCHURCH (59) avait déjà constaté.

Nous donnons dans le tableau suivant nos valeurs Rf dans le solvant butanol/acide acétique/eau en comparaison avec celles de CRAMER pour les acides aminés les plus usuels :

TABLEAU N° 1

Acide aminé	Rf		Acide aminé	Rf	
	trouvé	Cramer		trouvé	Cramer
Cystéine	0,07	0,07	Thréonine	0,25	0,35
Cystine	0,07	0,08	Alanine	0,30	0,38
Lysine	0,12	0,14	Proline	0,33	0,43
Histidine	0,14	0,20	Tyrosine	0,38	0,45
Arginine	0,15	0,20	Méthionine	0,47	0,55
Acide aspartique	0,16	0,24	Valine	0,49	0,60
Sérine	0,18	0,27	Tryptophane ..	0,50	0,50
Glycine	0,19	0,26	Phénylalanine .	0,57	0,58
Oxyproline	0,22	0,30	Isoleucine	0,59	0,72
Ac. glutamique .	0,24	0,30	Leucine	0,60	0,73

Nous avons mis en évidence dans notre hydrolysat peptidique 11 acides aminés; nous avons pu constater que seul le solvant phénolique permet de séparer nettement les acides aminés. En combinant l'isopropanol et le butanol, la Lysine forme une tache avec une substance inconnue et, de plus, le Glycocolle et la Sérine d'un côté et la Thréonine et l'Alanine de l'autre côté, ne se laissent pas séparer.

Deux points restent obscurs :

— Il ne nous a pas été possible de différencier la Leucine de l'Isoleucine au moyen des trois solvants isopropanol, phénol et butanol.

— Une tache ne correspondait à aucun des 20 acides aminés les plus connus. Elle avait une valeur Rf de 0,07 dans la phase phénolique.

Nous avons essayé d'élucider ces deux questions en employant des tests de contrôle à l'aide de substances connues. Un chromatogramme-bidimensionnel isopropanol-butanol a été séché à l'étuve à 100° pendant 20 minutes. Les taches fluorescentes dans les rayons ultra-violets ont été cernées par un trait de crayon. On découpe le chromatogramme en petites bandes se terminant en pointe de sorte qu'il y ait un ou deux acides aminés par bande. Chaque bande est placée entre deux plaques de verre, de façon que la pointe reste libre et que la partie large supérieure trempe dans un bain d'eau: l'eau est aspirée par capillarité et entraîne l'acide aminé vers la pointe où il se concentre au bout de quelques heures. Cette pointe de papier est ensuite utilisée pour étaler l'acide aminé en question sur le point de départ d'un papier Whatman avec lequel on effectue un chromatogramme monodimensionnel. A titre de comparaison, nous avons effectué des chromatogrammes-test avec des acides aminés connus. Le diagnostic de l'acide aminé cherché est seulement possible en employant pour le chromatogramme monodimensionnel un autre solvant que ceux utilisés pour la méthode bidimensionnelle. Pour tous les acides aminés à diagnostiquer, à l'exception de la Valine, de la Leucine et de la substance X, nous avons employé le solvant phénol-eau 8/2. Cette technique nous a permis de confirmer nos résultats antérieurs au moyen de la chromatographie bidimensionnelle. Les valeurs Rf ainsi obtenues correspondent à celles indiquées par Cramer. La Valine peut éventuellement être confondue avec la Méthionine; pour la déterminer, nous avons employé comme solvant le n-butanol ammoniaque 3 % qui nous a en même temps permis de différencier la Leucine de l'Isoleucine. Nous avons ainsi diagnostiqué exactement la présence de Valine et de Leucine par les valeurs Rf dans ce solvant: Valine 0,19; Méthionine 0,11; Leucine 0,32; Isoleucine 0,27.

Comme on le voit, nous obtenons des valeurs Rf bien distinctes de celles de Cramer.

Il nous restait à déterminer l'identité de la substance X. Dans la littérature, nous avons seulement trouvé deux acides aminés avec des valeurs Rf au-dessous de 0,10 dans le phénol : L'acide cystéique Rf = 0,06 et la Lanthionine Rf = 0,09. N'ayant pas ces deux acides aminés à notre disposition, nous avons essayé de faire le diagnostic en employant un autre solvant : le méthanol/eau = 8/2 auquel on ajoute 4 % de Pyridine. Ce solvant nous a permis de prouver que la substance X correpond à l'Acide cystéique.

En conclusion, nous pouvons dire que notre antibiotique d'adaptation est constitué par un noyau polypeptidique et par l'analyse chromatographique nous avons pu déterminer *les acides aminés neutres :* Glycocolle, Alanine, Valine, Leucine, Proline, Sérine et Thréonine; l'*acide aminé basique :* Lysine et *les acides aminés acides :* Acide aspartique, acide glutamique et acide cystéique.

CHAPITRE VIII

EXPÉRIENCES « IN VITRO »

Pour ces expériences, nous avons eu recours au milieu de jus de pomme de terre glycériné gélosé de J. MEYER, préparé comme nous l'avons décrit antérieurement. Ce substrat est chauffé à l'autoclave à 100° pour précipiter les protéines insolubles et les sels alcalino-terreux. On passe le milieu ajusté à pH = 7,4 à travers un filtre de Chardin, puis on répartit en tubes de 20 × 200 mm, à raison de 9 cc et on stérilise à 120° pendant 20 minutes.

D'autre part, nous avons préparé une gamme de notre antibiotique hydrosoluble en partant d'une solution de 1/10 dans le soluté physiologique. Par dilutions successives, nous avons obtenu les concentrations suivantes : 1/10 - 1/50 - 1/100 - 1/200 - 1/400 - 1/800 - 1/1 200 - 1/1 500 - 1/2 000 - 1/4 000 - 1/8 000 - 1/12 000 - 1/15 000 - 1/20 000.

Toutes ces dilutions ont été ajustées à un volume de 1 cc et introduites aseptiquement dans les 9 cc de milieu de jus de pomme de terre gélosé, de sorte que les dilutions d'antibiotique finales sont dix fois plus faibles.

Nous avons effectué les expériences concernant le pouvoir antibiotique avec deux espèces de bacilles acido-alcoolo-résistants entretenus sur milieu de jus de pomme de terre gélosé :

— une souche de *Mycobacterium phleï* 690 (Hauduroy),

— une souche de *Mycobacterium tuberculosis* 81 868 (Lister).

Les suspensions bactériennes pour l'ensemencement étaient préparées au moyen de cultures-mères âgées de 2 jours pour le *Mycobacterium phleï* et de 10 jours pour le *Mycobacterium tuberculosis*, émulsionnées aseptiquement dans le soluté physiologique contenant 1 % de Tween 80, de sorte de 0,1 cc contenaient entre 10 et 20 millions de germes. La concentration était toujours contrôlée opacimétriquement au *photocolorimètre Lumetron*.

Chaque série d'expérience comportait en plus 4 tubes-témoins sans antibiotique. Deux étaient additionnés seulement de l'excipient : soluté physiologique + Tween et non ensemencés pour le contrôle de la stérilité

du milieu soumis aux mêmes manipulations; les deux autres tubes étaient additionnés également de soluté physiologique + Tween, mais inoculés par nos suspensions bactériennes.

Le milieu de jus de pomme de terre glycériné gélosé est liquéfié par chauffage, puis refroidi à 50-55° pour y introduire les dilutions d'antibiotique. On mélange soigneusement par rotation entre les paumes des mains, en évitant l'introduction de bulles d'air, puis on laisse se solidifier en position inclinée. Finalement, nous avons ensemencé les deux gammes de tubes à l'aide de 0,1 cc de la suspension bactérienne respective.

Nous avons disposé les cultures à 37° et contrôlé le développement des colonies à partir du 2e jour. A notre surprise, toutes les cultures étaient positives après 48 heures pour le *Mycobacterium phleï* et après 10 jours pour le *Mycobacterium tuberculosis*. Le nombre des colonies était sensiblement identique sur les milieux témoins et les milieux à l'antibiotique, et ceci même dans les tubes contenant le principe antituberculeux à la dilution de 1/100, *ce qui permet de conclure à l'absence de tout pouvoir antibiotique « in vitro »*.

Des expériences semblables, effectuées en supprimant *le Tween* 80 qui aurait pu éventuellement adsorber ou inhiber notre antibiotique d'adaptation, *nous ont fourni les mêmes résultats négatifs*.

Nous avons alors repris ces recherches en pensant que notre produit antituberculeux pourrait être freiné ou détruit par un processus d'oxydation, phénomène assez fréquemment observé dans l'étude des enzymes antibiotiques.

Michener et Andersen (60) ainsi que Ohresser (61) entre autres, ont pu constater ce fait dans leurs études sur le *Lupulon*, et ils ont pu y obvier par l'addition au substrat antimicrobien de 0,1 % d'*acide l-ascorbique*. Le mécanisme antioxydant de la *Vitamine C* s'exerce par sa fonction diénolique facilement oxydable, ce qui lui confère des propriétés fortement réductrices en la transformant en acide déhydroascorbique, réaction réversible d'oxydo-réduction qui intervient dans la plupart des processus enzymatiques tissulaires.

Nous avons ainsi repris nos deux séries d'expériences en introduisant dans le milieu de jus de pomme de terre glycériné gélosé, liquéfié à la température de 50°, 1 cc d'une solution à 10 % d'acide ascorbique. Après ensemencement, les cultures étaient disposées à 37° et nous avons enregistré les résultats suivants :

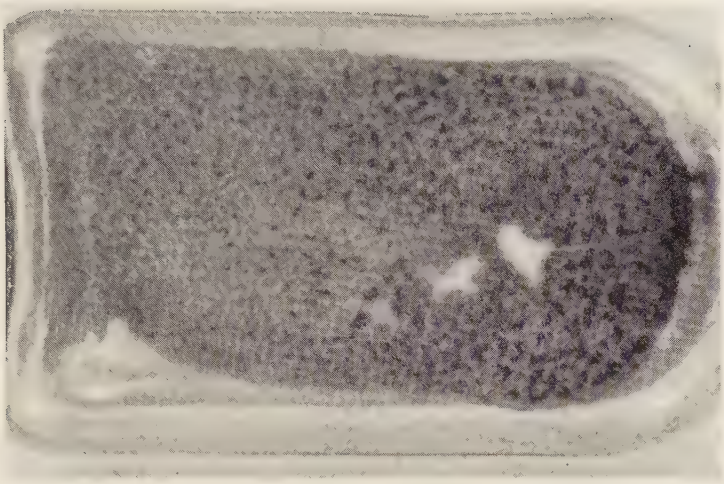

Fig. 1

Aspect d'une culture adulte d'A. amstelodami.

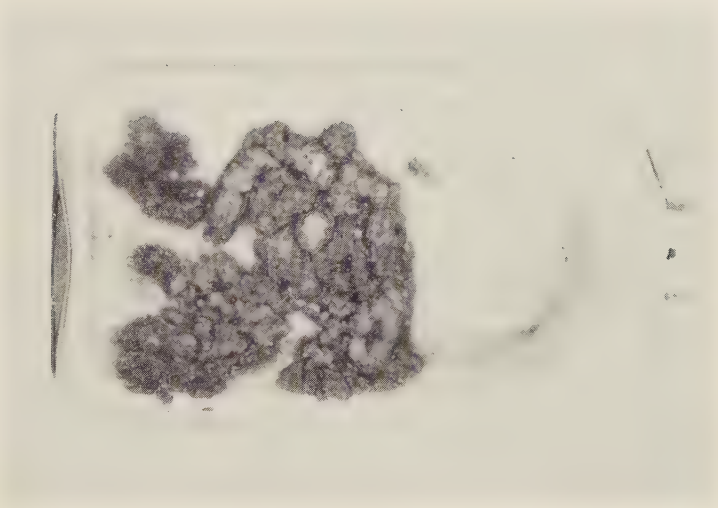

Fig. 2

Aspect d'une culture d'A. amstelodami sur une culture de BK.

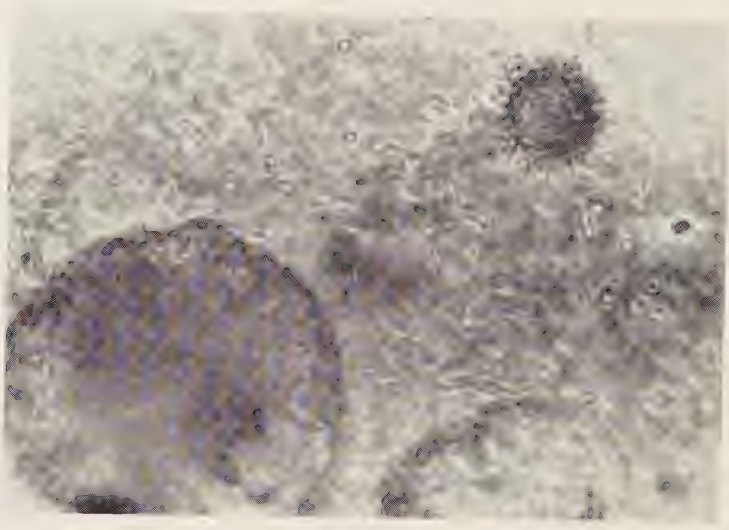

Fig. 1

Périthèce et ampoule conidiophore.

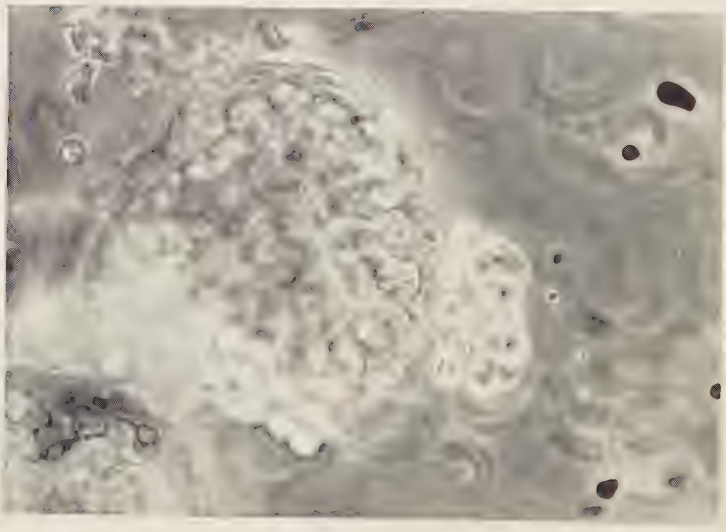

Fig. 4

Périthèce fermé.

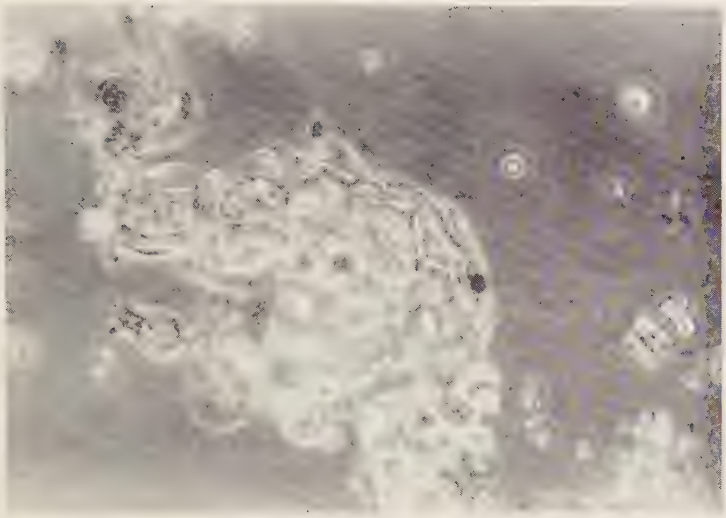

Fig. 5

Périthèce ouvert montrant les asques et les ascospores.

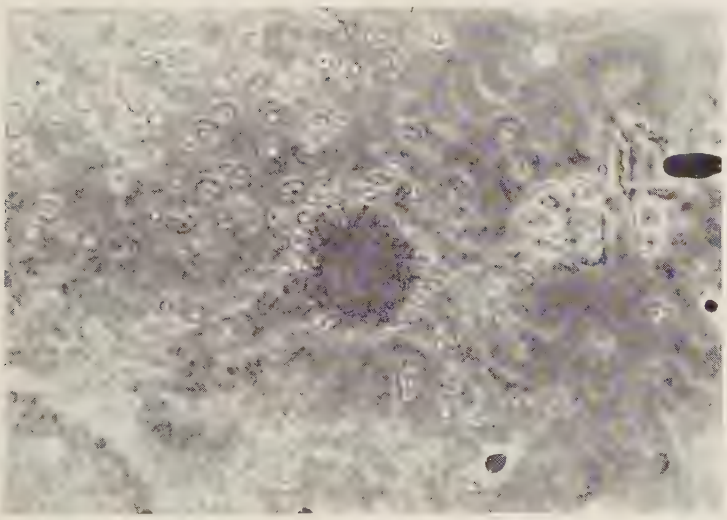

Fig. 6

Ampoule canidiophore.

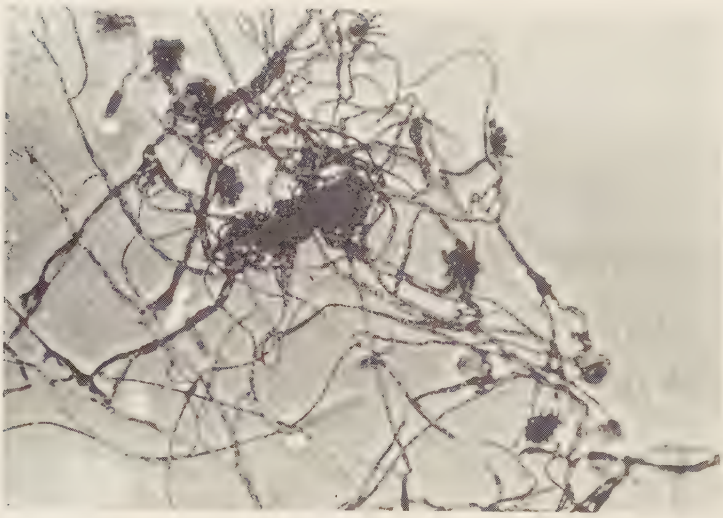

Fig. 7

Aspect général du mycélium sporifère.

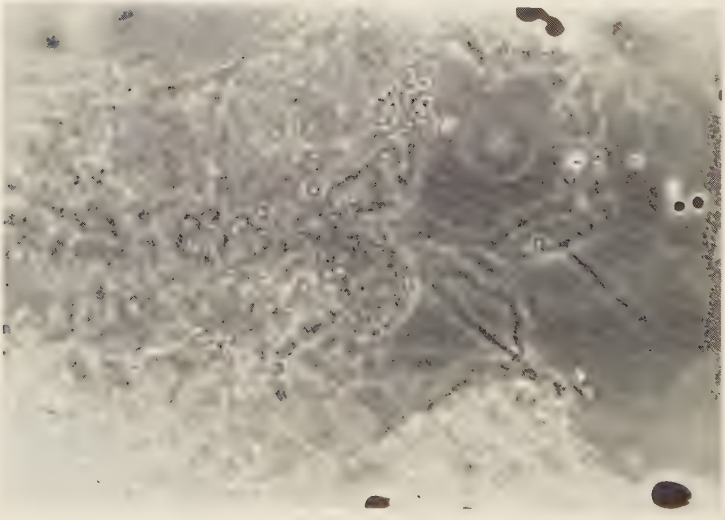

Fig. 8

Mycélium envahissant une colonie de BK.

TABLEAU N° 2

Age de la culture	Dilution d'antibiotique							Témoin
	1/100	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/12000	
Mycobacterium phleï								
4 jours	—	—	—	—	+	+	+	+
6 jours	—	—	+	+	+	+	+	+
8 jours	—	±	+	+	+	+	+	+
10 jours	+	+	+	+	+	+	+	+
15 jours	+	+	+	+	+	+	+	+
20 jours	+	+	+	+	+	+	+	+
Mycobacterium tuberculosis								
4 jours	—	—	—	—	—	—	—	—
6 jours	—	—	—	—	—	—	—	±
8 jours	—	—	—	—	—	—	±	+
10 jours	—	—	—	—	—	±	+	+
15 jours	—	—	—	—	—	+	+	+
20 jours	—	—	—	—	—	+	+	+

Interprétation :

On voit ainsi que notre antibiotique d'adaptation a un certain pouvoir antimicrobien dans ces conditions, qui a encore freiné l'amorcement de la croissance de Mycobacterium phleï le 6e jour, à la concentration de 1/500, phénomène qui se répercute même partiellement jusqu'au 8e jour de culture. Ce pouvoir anti-acido-alcoolo-résistant est plus manifeste chez Mycobacterium tuberculosis, à développement notoirement plus lent. Ainsi la dilution d'antibiotique de 1/8 000 retarde l'amorcement de la culture pendant 10 jours et le nombre des colonies devient vers le 15e jour sensiblement comparable à celui sur milieu témoin âgé de 8 jours. *On peut donc affirmer l'existence d'un pouvoir antituberculeux de notre extrait de milieu de cultures associées*, substance conservant en partie sa propriété « *in vitro* » en présence d'un réactif anti-oxydant, condition qui doit être sauvegardée dans les humeurs et les tissus d'un organisme en état de bonne santé et à métabolismes équilibrés.

Pour nous rapprocher davantage des conditions biologiques « *in vivo* », nous avons effectué une troisième série d'expériences au moyen de la technique suivante :

L'intérêt du milieu au sang pour la culture du Bacille tuberculeux a été souligné par un grand nombre d'auteurs, parmi lesquels nous citons

Hinglais et Langlade (62). Nous avons utilisé comparativement du sang humain normal et du sang de lapin.

Le sang est prélevé aseptiquement par ponction veineuse, dans un tube stérile contenant 2 cc de la *solution d'anticoagulant de* Tarshis, appelée par cet auteur « *solution ACD* » et préparée comme suit :

Acide citrique	2,35 g
Citrate de sodium	6,65 g
Glucose (dextrose)	11,50 g
Eau distillée q.s.p.	100,00 cc

On recueille dans le tube stérile 10 cc de sang, on agite soigneusement pour éviter la coagulation. Pour le sang de lapin, nous avons travaillé avec 1 cc de solution ACD et 5 cc de sang.

D'autre part, on liquéfie le milieu de jus de pomme de terre glycériné gélosé (8 cc), on laisse refroidir à 45°-50° et on y ajoute 2 cc de sang citraté. On mélange soigneusement au bain-marie à 50° et on ajoute les différentes dilutions de notre antibiotique d'adaptation. On mélange encore, puis on retire du bain-marie pour laisser refroidir le milieu au sang antibiotique en position inclinée. Il est bien entendu que chaque gamme en expérience est accompagnée des quatre tubes témoins précités pour le contrôle de la stérilité d'un côté et de la croissance normale des Bacilles acido-alcoolo-résistants de l'autre côté.

Les ensemencements sont pratiqués à l'aide de nos suspensions de *Mycobacterium phleï* et de *Mycobacterium tuberculosis* préparées comme ci-dessus. Afin d'éviter l'intervention éventuelle d'un facteur individuel, chaque expérience a été renouvelée trois fois avec du sang provenant de sujets humains ou animaux différents. Le contrôle de l'amorcement et de la multiplication des bactéries acido-alcoolo-résistantes est effectué à partir du 2e jour de la culture. Les résultats observés sont consignés dans les tableaux suivants selon le code classique :

culture nulle : —

rares colonies : +

colonies assez nombreuses isolées : ++

très nombreuses colonies confluentes : +++

TABLEAU N° 3

Mycobacterium phleï

Age de la culture en jours	Dilution d'antibiotique												
	1/100	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/12000	1/20000	1/40000	1/80000	1/100000	1/200000	Témoin
Milieu au sang humain													
4 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
6 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ + +
8 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+ + +
10 jours	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+ + +
15 jours	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+ +	+ +	+ + +
20 jours	—	—	—	—	—	—	+	—	+ +	+ +	+ + +	+ + +	— — +
Milieu au sang de lapin													
4 jours		—			—	—	—	—	—		+		+
6 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ + +
8 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+ + +
10 jours	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+ + +
15 jours	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+ +	+ +	+ + +
20 jours	—	—	—	—	—	+	+	+	+ +	+ +	+ + +	+ + +	— +

TABLEAU N° 4

Mycobacterium tuberculosis

Age de la culture	Dilutions d'antibiotique											
	1/100	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/12000	1/40000	1/80000	1/100000	1/200000	Témoin
Milieu au sang humain												
4 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
8 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
10 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
15 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+ + +
20 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+ + +
Milieu au sang de lapin												
4 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
8 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
10 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+ +
15 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+ + +
20 jours	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+ +	+ + +

Interprétation :

En considérant ces résultats on peut tirer les conclusions suivantes :

Le sang de lapin et le sang humain constituent des milieux excellents pour la culture des bacilles acido-alcoolo-résistants comme cela ressort surtout de nos cultures témoins. Nous pouvons donc confirmer les résultats de HINGLAIS et LANGLADE. On voit que le sang de lapin est plus favorable pour l'amorcement de la culture de ces germes. Cet effet stimulateur se manifeste également en présence de notre antibiotique, puisque le développement des deux Mycobactéries est plus précoce et plus abondant sur le milieu au sang de lapin. Sur ce substrat l'action antibiotique de notre produit s'exerce à des dilutions de 1 80 000 pour *Mycobacterium phleï* et de 1 100 000 pour *Mycobacterium tuberculosis*. Cependant, le premier germe semble définitivement inhibé à la dilution de 1/4 000, alors que le second n'a pas évolué pendant les premiers 20 jours à la dilution de 1/80 000.

Cette action antibactérienne est un peu plus prononcée dans les milieux au sang humain, où nous constatons une inhibition définitive de la croissance de Mycobacterium phleï à la dilution de 1 10 000 et du Bacille tuberculeux à 1 100 000. Nous voyons par conséquent que l'introduction du sang total dans le milieu de culture se prête beaucoup mieux à la démonstration de l'action antibiotique de notre produit contre les bactéries acido-alcoolo-résistantes que les milieux habituellement employés, même additionnés de Vitamine C. Il nous semble aussi que cette façon d'agir nous rapproche beaucoup plus des conditions biologiques que l'on trouve « *in vivo* » et l'on peut parler effectivement d'un pouvoir antibiotique de notre produit, vu les taux de dilution très poussés, inhibant encore la croissance de nos bactéries acido-alcoolo-résistantes.

On voit par ces expériences que le pouvoir antimicrobien ainsi que son interprétation sont tout à fait relatifs suivant les conditions expérimentales qui, si elles sont régies par les règles optimales, répondent à la définition même des antibiotiques.

Ayant ainsi déterminé les conditions optimales pour étudier « *in vitro* » l'action antibiotique de notre produit sur les bactéries acido-alcoolo-résistantes, nous avons jugé nécessaire d'étendre nos recherches sur son action « *in vivo* ».

CHAPITRE IX

EXPÉRIENCES « IN VIVO »

Avant de commencer nos expériences proprement dites sur l'action thérapeutique de notre antibiotique d'adaptation, nous avons affectué des recherches sur la toxicité du produit.

Nous avons injecté par voie sous-cutanée et intrapéritonéale des souris blanches adultes, toutes d'un poids sensiblement égal; ces souris étaient partagées en lots de 5 pour chaque concentration mise en œuvre, gardées en observation pendant 15 jours puis sacrifiées aux fins d'autopsie.

Les solutions d'épreuve étaient préparées extemporanément et nous avons injecté les doses suivantes :

Injection sous-cutanée	*Injection intrapéritonéale*
10 mg	10 mg
25 mg	25 mg
50 mg	50 mg
100 mg	100 mg
200 mg	200 mg
500 mg	

Les examens macroscopiques et les coupes histologiques des différents organes ne montraient aucune lésion pathologique. On voit ainsi que le produit n'a pas de toxicité aux doses employées par nous.

En nous rapportant à ces recherches, nous avons ensuite poursuivi nos expériences sur des cobayes tuberculisés. Nous avons employé 80 cobayes mâles d'un poids moyen de 500 g que nous avons partagés en cinq groupes que nous avons isolés dans des cages et nourris de façon identique. Les cobayes ont été tuberculisés selon la méthode classique en injectant une suspension homogène de 0,01 mg de Bacilles tuberculeux, souche 81 868, par voie sous-cutanée dans la région inguinale postérieure. La suspension bactérienne était préparée au moyen d'une culture sur milieu de Lœwenstein-Jensen âgée de 12 jours, dont nous avons prélevé aseptiquement une dose correspondant à environ 0,1 g. Le prélèvement est exactement pesé sur la balance de précision et introduit quantitativement dans un tube à hémolyse stérile, puis dilué dans le soluté physiologique jusqu'à une dilution finale de 0,1 mg/cc de Bacilles tuberculeux.

Le traitement de tous les animaux (en dehors des témoins) a débuté le 20e jour après l'inoculation. A ce moment, le ganglion inguinal était palpable chez tous les cobayes. Nos expériences étaient effectuées soit avec notre antibiotique d'adaptation seul, soit combiné à d'autres tuberculostatiques spécifiques pour déterminer éventuellement une action cumulative.

A titre de comparaison, nous avons prévu une série d'animaux traités au moyen d'Isoniazide + Streptomycine.

Le protocole expérimental était le suivant :

Série A : 25 mg d'*antibiotique d'adaptation* + 25 mg de *Pantothénate de calcium*, devant améliorer la tolérance de l'antibiotique, comme par exemple dans la streptomycinothérapie.

Série B : 25 mg d'*antibiotique d'adaptation* + 25 mg d'*Isoniazide* + 25 mg de *Pantothénate de calcium*.

Série C : 25 mg d'*antibiotique d'adaptation* + 25 mg de *Streptomycine* + *Pantothénate de calcium*. Nous avons employé la *Didromycine pantothénique Spécia*, dont un flacon renferme à l'état sec : 0,20 g de Dihydrostreptomycine à l'état de pantothénate et 0,80 g de Dihydrostreptomycine à l'état de sulfate, soit au total 1 g de Dihydrostreptomycine base, que nous avons dissous dans 10 cc d'eau bidistillée stérile.

Série D : 25 mg d'*Isoniazide* + 25 mg de *Streptomycine*.

Série E : Témoins *non traités*.

Tous ces traitements ont été administrés aux doses indiquées trois fois par semaine par voie sous-cutanée.

L'action thérapeutique de ces différentes médications a été d'abord contrôlée par l'état général, les courbes de poids et de température. Après 90 jours, nous avons sacrifié dans chaque lot le cobaye le plus malade pour procéder à l'examen macroscopique et histologique. Dans les tableaux qui suivent, nous donnons le protocole expérimental pour quatre animaux de chaque série.

TABLEAU N° 5 - *Série A*

Jour	Poids en grammes				Température				Remarques
	Cobayes N°				Cobayes N°				
	1	2	3	4	1	2	3	4	
1	530	550	500	560	37,9	37,7	37,1	38,6	Inoculation
10	560	540	510	560	38,1	37,0	36,5	38,0	
20	540	530	480	540	37,2	36,9	37,1	37,7	Traitement
30	520	520	450	530	37,2	36,5	37,0	37,4	
40	520	500	460	550	37,5	36,5	36,6	36,8	
50	530	530	450	540	37,2	37,0	36,3	37,1	
60	520	540	470	550	37,7	36,5	36,7	37,0	
70	520	530	470	570	37,3	36,9	36,4	37,2	
80	530	540	490	540	37,3	37,2	36,5	36,8	
90	540	560	520	510	37,1	37,4	36,8	37,0	N° 4 sacrifié
100	560	550	540		37,4	36,9	37,0		
110	550	570	570		37,0	36,8	36,7		
120	560	520	540		37,3	37,1	36,9		
130	550	520	560		37,5	37,1	36,9		
140	530	510	570		37,4	37,3	37,2		
150	450	490	550		37,6	37,4	37,0		
160	460		540		37,8		36,9		N° 2 mort
170	420		550		37,9		36,8		

TABLEAU N° 6 - *Série B*

Jour	Poids en grammes				Température				Remarques
	Cobayes N°				Cobayes N°				
	5	6	7	8	5	6	7	8	
1	450	440	500	480	37,9	38,2	38,2	38,0	Inoculation
10	440	450	490	500	38,1	38,2	37,8	38,3	
20	440	460	510	520	38,5	38,1	38,4	38,6	Traitement
30	460	460	540	560	38,6	38,4	37,9	38,6	
40	480	460	580	580	38,1	37,8	37,8	38,0	
50	480	450	580	600	37,3	37,4	37,7	38,3	
60	500	430	610	610	37,3	38,3	37,5	37,5	
70	510	430	580	620	37,6	37,8	37,0	37,5	
80	500	440	600	660	37,4	37,6	37,3	37,8	
90	510	450	580	650	37,4	37,6	37,2	37,9	N° 5 sacrifié
100		460	610	700		37,0	37,0	37,4	
110		450	650	730		37,2	36,9	37,5	
120		460	650	720		37,3	37,4	37,7	
130		480	680	710		37,6	37,3	37,8	
140		490	690	740		37,7	37,5	37,6	
150		530	690	750		37,9	37,8	38,0	
160		540	680	760		37,8	37,7	37,8	
170		490	680	770		38,0	37,9	37,7	

TABLEAU N° 7 - *Série C*

Jour	Poids en grammes				Température				Remarques
	Cobayes N°								
	9	10	11	12	9	10	11	12	
1	480	560	490	510	38,1	37,8	38,0	38,5	Inoculation
10	480	550	500	520	38,1	38,3	38,2	38,4	
20	490	570	520	530	38,6	38,0	38,5	38,6	Traitement
30	490	570	540	560	38,4	37,8	37,8	38,0	
40	530	560	550	610	37,8	37,7	37,9	37,6	
50	570	590	570	630	37,5	37,6	37,5	37,3	
60	600	610	590	660	37,9	37,4	37,5	37,7	
70	590	590	600	670	37,4	37,8	37,3	37,6	
80	640	600	620	690	37,2	37,6	37,3	37,8	
90	630	600	590	690	37,7	37,2	37,6	37,9	N° 12 sacrifié
100	670	620	570		37,4	37,1	37,4		
110	700	630	580		37,4	37,3	36,5		
120	680	640	580		37,3	37,5	37,3		
130	710	660	600		37,5	37,4	37,6		
140	750	680	610		37,5	37,6	37,5		
150	760	670	590		37,8	37,5	37,7		
160	780	680	550		37,7	37,7	37,9		
170	760	650	530		37,8	37,9	37,9		

TABLEAU N° 8 - *Série D*

Jour	Poids en grammes				Température				Remarques
	Cobayes N°								
	13	14	15	16	13	14	15	16	
1	560	510	480	470	38,1	37,9	37,8	38,3	Inoculation
10	560	500	470	480	38,3	38,2	27,9	38,2	
20	570	500	480	460	38,7	38,4	38,2	38,6	Traitement
30	590	530	500	480	38,1	37,8	38,1	38,0	
40	610	530	490	500	37,6	37,8	37,9	37,9	
50	600	520	520	540	37,4	37,5	37,8	37,4	
60	620	520	530	550	37,5	37,6	37,4	37,6	
70	660	530	530	540	37,7	37,6	37,5	37,7	
80	670	560	560	570	37,6	37,5	37,7	37,8	
90	650	570	550	580	37,8	37,9	37,6	37,7	N° 16 sacrifié
100	680	590	570		37,6	37,7	37,8		
110	700	630	600		37,8	38,1	37,5		
120	690	650	610		37,5	37,8	37,5		
130	700	680	590		37,6	37,7	37,7		
140	710	680	560		37,8	37,7	37,9		
150	700	670	510		37,9	37,8	38,2		
160	670	610	460		38,2	38,0			N° 15 mort TB
170	680	580			38,1	38,4			

TABLEAU N° 9

Série E

Jour	Poids en grammes				Température				Remarques
	Cobayes N°								
	17	18	19	20	17	18	19	20	
1	550	500	550	530	38,4	37,2	38,3	37,4	Inoculation
10	550	460	530	560	37,6	37,5	37,7	37,3	
20	580	490	550	580	37,3	37,9	37,6	37,1	
30	590	420	550	570	37,9	38,4	37,5	37,5	
40	580	380	520	580	38,2	38,8	37,9	38,1	N° 18 mort 42e j.
50	560		480	550	37,8		38,1	37,8	
60	520		460	540	38,3		38,0	37,8	
70	550		460	520	38,4			38,2	N° 19 mort 69e j.
80	530			470	37,9			38,4	
90	510			440	38,3			38,6	N° 20 mort 95e j.
100	520				38,5				
110	490				38,7				
117	440								N° 17 mort 118e j.

Interprétation :

En considérant ces travaux, on se rend compte que notre souche de BK est hautement pathogène, *puisque la plupart des animaux de la série E ont succombé dans les quatre premiers mois de l'expérience.* L'autopsie de ces animaux, ainsi que l'examen anatomopathologique ont prouvé que la mort était due à une tuberculose aiguë évolutive.

Le traitement avec l'antibiotique d'adaptation seul a fait ses preuves, puisque tous les cobayes de cette série (A) ont survécu pendant toute la durée de l'expérience. Cependant, en considérant leur état général et l'évolution des courbes de température, il faut reconnaître que les résultats sont moins favorables que pour les trois autres séries de traitements. Chez quelques animaux nous avons constaté une réaction dermique au niveau de l'injection se manifestant par une alopécie et une certaine induration de la peau. Ces symptômes n'avaient rien de grave puisque dès l'interruption du traitement tout rentrait dans l'ordre.

Les mêmes symptômes se manifestaient dans la série B où nous avons combiné notre antibiotique avec l'INH, alors que dans la combinaison avec la Streptomycine, ils faisaient constamment défaut. On pourrait mettre ces réactions sur le compte d'une impureté de notre antibiotique et qui serait neutralisée par la Streptomycine.

Les animaux des séries B et C ont très bien supporté les traitements

combinés, leur poids a régulièrement augmenté, ils étaient très vivaces, leur pelage était lisse et brillant.

En comparant ces faits avec ceux de la série D, on peut dire que *les traitements associés avec notre antibiotique donnent des résultats plus favorables que la combinaison INH + Streptomycine*, où après les quatre mois de traitement la courbe du poids commence à diminuer et où nous avons enregistré plusieurs décès.

Finalement, il faut attirer l'attention sur l'influence de notre antibiotique sur la courbe de température qui dans certains cas est tombée en-dessous de la normale et ceci aussi bien dans la série à traitement intégral que dans celles à thérapie associée.

Résultat des examens anatomo-pathologiques:

Les animaux sacrifiés le 90e jour ont été examinés au point de vue des lésions anatomo-pathologiques et nous rapportons dans le tableau suivant les observations macroscopiques, l'indice lésionnel étant représenté de la façon suivante :

aucune lésion = 0
1 à 5 tubercules = +
6 à 10 tubercules = ++
11 à 20 tubercules = +++
plus de 20 tubercules = ++++

Nous avons tenu compte du point d'inoculation, des ganglions inguinaux, des ganglions lombaires, des ganglions mésentériques, des ganglions axilaires et cervicaux, de la rate, du foie et du poumon.

TABLEAU N° 10

Série	Point d'inoculation	Ganglions				Rate	Foie	Poumon
		inguinaux	lombaires	mésentériques	axilaires, cervicaux			
A	+	+	++	+	0	++	+	+
B	+	+	+	0	0	+	+	+
C	+	+	0	0	0	+	0	0
D	+	+	0	0	0	+	0	0
E	++++	++++	++++	+++	+++	++++	++++	++

Les cobayes traités par l'antibiotique d'adaptation seul présentaient des chancres d'inoculation importants, qui ont été stabilisés et ne se sont jamais fistulisés. En général, le système ganglionnaire est hypertrophié,

mais les lésions ne présentent de loin pas l'importance de celles des animaux témoins. Le foie et la rate ont conservé sensiblement leur volume normal et les lésions macroscopiques sont pratiquement inexistantes. Les poumons sont le siège de quelques petites lésions en grain de semoule très localisées.

La combinaison antibiotique d'adaptation + INH semble moins favorable que celle de l'antibiotique d'adaptation avec la Streptomycine. Les deux antibiotiques spécifiques exercent une action curative plus nette sur les ganglions lymphatiques et font en général avorter les chancres d'inoculation. L'association *antibiotique d'adaptation + Streptomycine* agit aussi favorablement que l'*association INH + Streptomycine* et on note surtout une diminution nette des lésions du foie et du poumon. Par contre, dans les deux cas, la rate reste hypertrophiée avec des lésions qui nous ont semblé macroscopiquement bien délimitées. Nous aurons l'occasion d'y revenir dans l'étude histologique.

Étude des coupes histologiques :

Cette étude a été effectuée par les Docteurs Cl. Weil et A. Rebel que nous remercions ici de leur aimable collaboration. Ces histologues ont objecté dans leur interprétation que dans beaucoup de cas il est difficile d'affirmer la nature spécifiquement tuberculeuse des lésions, aussi l'appréciation ne tient-elle compte que de l'intensité des lésions, *étant présumé que ces lésions sont tuberculeuses.*

Nous donnons succinctement un aperçu général des organes (poumons, rate, foie et rein) de trois cobayes de chaque série :

Série A = Aspergillus seul :

Ganglions inguinaux : La plupart des formations spécifiques folliculaires et caséo-folliculaires occupant la totalité de ces coupes sont considérablement remaniées. Certaines plages de scléroses ont subi une transformation hyaline marquée, tandis que des follicules de petite taille ont subi une modification scléreuse presque complète. Toutes ces formations spécifiques sont entourées d'une gaine scléreuse dense. La coloration au Ziehl-Neelsen n'a pas permis de déceler de BK dans les petits îlots de nécrose caséeuse persistant au sein des formations spécifiques.

Rate : Très nombreux petits nodules spécifiques de type épithélioïde, sans formations giganto-cellulaires et sans nécrose caséeuse. Un certain nombre de ces nodules sont en transformation scléreuse. La coloration au Ziehl-Neelsen ne permet pas de déceler de BK, même dans les nodules paraissant encore actifs.

Foie : Très nombreuses images de dégénérescence probablement graisseuse des cellules hépatiques. Congestion vasculaire intense, pas

de nécrose, pas d'infiltration inflammatoire. Quelques petits foyers hémorragiques. Pas de symptôme pathologique et bactériologique de tuberculose spécifique.

Poumons : Alvéolite congestive diffuse et congestion d'intensité moyenne rappelant un état de pneumonie réticulée hypertrophique. Nombreuses formations spécifiques à structure folliculaire, sans nécrose caséeuse et sans cellules de Langhans. Autour de ces formations spécifiques sans symptôme scléreux, on note de rares exsudats œdémateux intra-alvéolaires et de petites suffusions hémorragiques difficiles à interpréter (peut-être lésions agoniques). Pas de caséification proprement dite. Persistance de plages de tissu parenchymateux sain.

Reins : Organe peu perturbé. Congestion peu marquée. Quelques petits foyers hémorragiques. Infiltrations lympho-monocytaires localisées et réaction scléreuse de faible intensité. Pas de structure anatomique spécifique.

Conclusion :

Les lésions ulcéro-caséeuses des ganglions, des rates et des reins sont considérablement remaniées par une évolution sclérogène. Symptômes de stabilisation de la tuberculose folliculaire pulmonaire et hépatique avec disparition des formes bactériennes tuberculeuses typiques.

Série B = Aspergillus + INH :

Ganglions inguinaux : En général présence de nodules nécrotiques parsemés de polynucléaires altérés. La coloration de Ziehl-Neelsen ne permet pas d'y déceler de BK. En bordure des nodules on note une gaine fibrineuse avec de nombreuses formations folliculaires très remaniées par une sclérose d'enkystement et de pénétration. Ces follicules sont de type épithélioïde, sans nécrose ni éléments giganto-cellulaires.

Rate : On trouve dans ces coupes une congestion marquée. Le parenchyme splénique partiellement conservé est parsemé de nombreuses travées scléreuses et de nodules scléreux petits, entourés d'un manchon d'infiltrations lympho-mono-histiocytaires avec parfois des formations épithélioïdes. Nombreux foyers nécrotico-hémorragiques et symptômes de dégénérescence des cellules des travées de Remak avec perturbation de la structure anatomo-histologique. Pas de lésions spécifiquement tuberculeuses et absence de BK après coloration au Ziehl-Neelsen.

Foie : Congestion vasculaire intense avec des plages étendues de nécrose ischémique infarctoïde, en partie hyalinisées et en voie de réorganisation. Rares formations folliculaires très altérées par la nécrose, situées en bordure des plages infarctoïdes. Le parenchyme hépatique conservé réagit par des réactions inflammatoires de type cirrhogène. Infiltrats lymphocytaires dans les espaces portes et nombreux néocanalicules biliaires. Par endroits dégénérescence probablement graisseuse au niveau des travées de Remak.

Poumons : Persistance de plages de poumon encore intact au sein d'une pneumonie réticulée hypertrophique assez marquée. Importante infiltration lympho-monocytaire et quelques formations folliculaires encore florides, centrées parfois par une nécrose liquéfiée où l'on trouve encore de rares B K.

Conclusion :

En général présence de lésions tuberculeuses disséminées et nécrosantes, mais dont l'évolution a été freinée. Dans tous les organes on trouve en effet une sclérose intense, anormale pour cette tuberculose expérimentale. Il s'agit d'une sclérose d'enkystement des foyers caséeux et de réorganisation des foyers folliculaires. Absence de tout élément cellulaire plasmodial du type de Langhans.

Série C = Aspergillus + Streptomycine :

Ganglions inguinaux : Dans l'ensemble des coupes on trouve de petites cavernes remplies de débris nécrotiques et caséeux, et entourées de multiples formations folliculaires. La structure du ganglion a pris l'aspect d'un granulome spécifique, dissocié par des formations sclé-reuses qui, dans certains cas, réorganisent complètement l'architecture des follicules spécifiques. Absence de B K à la coloration de Ziehl-Neelsen.

Rate : On trouve en général de nombreux petits nodules scléreux et quelques images de dégénérescence au niveau des cellules des cordons de Bilroth. Présence de quelques plages de nécrose de taille moyenne, où persistent encore des capsules de Malpighi. Absence de cellules géantes et d'éléments épithélioïdes. Infiltrats diffus des cellules mono-histio-cytaires. Congestion vasculaire peu marquée. Absence de foyers hémor-ragiques et d'organisation pouvant faire penser à un follicule tuber-culeux.

Foie : Congestion vasculaire moyenne. Absence générale d'infiltra-tion inflammatoire et persistance de la structure vasculaire avec de rares formations spécifiques de structure folliculaire et de très rares plages de nécrose de type ischémique. Dans le parenchyme hépatique on note dans presque tous les espaces portes une réaction lymphoïde avec différenciation canaliculaire des travées hépatiques avoisinantes et dans tous les lobules existe une stéatose disséminée. Pas de B K à l'examen bactériologique.

Poumons : Dans toutes les coupes nous notons des symptômes de congestion avec épaississement diffus des travées alvéolaires et petits infiltrats inflammatoires. Nombreux petits nodules lympho-monocy-taires disséminés dans le parenchyme pulmonaire. Lésions de nécrose de taille moyenne avec organisation épithélioïde et entourées de zones d'atélectasie. Absence de cellules de Langhans et, en de nombreux points, réaction scléreuse accompagnée de dilacération faible du tissu

élastique. Nombreuses plages de tissu pulmonaire à anatomie microscopique parfaitement conservée. L'image histologique traduit dans l'ensemble une incontestable tendance à la scélérose et à l'organisation.

Conclusion :

En général les lésions tuberculeuses de tous les organes sont involutives, en voie d'enkystement et d'organisation scléreuse ; ceci est surtout net dans les coupes de ganglions inguinaux, des rates et des poumons. On ne peut affirmer l'origine tuberculeuse de certaines lésions hépatiques, notamment les plages ischémiques, et surtout les plages inflammatoires périportales. Les examens bactériologiques directs n'ont pas permis de déceler de bacilles acido-alcoolo-résistants.

Série D = INH + Streptomycine :

Ganglions inguinaux : Dans toutes les coupes absence de plage de nécrose et de cellules géantes. Les formations folliculaires présentent des réactions scléreuses de réorganisation très prononcées. Les formations caséo-folliculaires ont disparu ou ont pris une architecture de sclérose remarquable.

Rate : Persistance de corpuscules de Malpighi dans un parenchyme splénique très moyennement perturbé par de très nombreuses travées scléreuses disséminées. Nombreux micronodules scléreux entourés d'infiltrats lympho-mono-histiocytaires à structure parfois épithélioïde. Pas de nodules spécifiques caséo-folliculaires. La transformation scléreuse de toutes ces formations est très prononcée. Absence de BK à l'examen microscopique direct.

Foie : Les lésions spécifiques sont surtout du type folliculaire, très rarement caséo-folliculaire. Dans ces foyers le caractère de spécificité a disparu par une réaction sclérogène très marquée du granulome tuberculeux. Les cavernules sont peu sécrétantes, à parois fibreuses et montrant dans certains cas un métamorphisme hyalin presque total. Le parenchyme hépatique de voisinage est presque dépourvu d'infiltrations inflammatoires lymphocytaires. En somme, presque pas d'infiltration inflammatoire ou infiltrat sclérogène remarquable. Absence de foyer nécrotico-hémorragique, rares images de dégénérescence graisseuse au niveau des cellules des travées de Remak. Pas de BK décelables.

Poumons : On note toujours de nombreuses formations nodulaires de type purement folliculaire, rarement caséo-folliculaire. Leur structure anatomique est fortement remaniée par une sclérose de pénétration qui dissocie le tissu du granulome épithélioïde. Plusieurs zones d'alvéolite congestive avec de très rares foyers hémorragiques. Pas d'image de nécrose, quelques zones de transformation hyaline du tissu nodulaire et de parenchyme en état de pneumonie réticulée hypertrophique. Plus de lésions spécifiquement tuberculeuses, pas de BK décelables à l'examen direct.

Conclusion :

Les formations tuberculeuses sont fortement remaniées dans tous les organes par une évolution sclérogène, surtout manifeste dans les ganglions et le foie.

Série E = témoins non traités :

Ganglions inguinaux : Farcis de cavernules remplies de matières nécrotiques et de polynucléaires fortement altérés. A l'examen microscopique direct on trouve des amas de BK (5-6 bactéries dans 10 champs).

Rate : Bouleversement complet de la structure du parenchyme splénique. Nombreux foyers hémorragiques, vastes zones de nécrose et de caséification avec infiltration lympho-monohistiocytaire diffuse. Pas de réaction épithélioïde, les cellules encore visibles sont en voie de dégénérescence hyaline. Hypertrophie et congestion intense de tout l'organe. BK positifs à l'examen direct.

Foie : En général, persistance de la lobulation hépatique par petites zones du parenchyme. Très nombreuses cellules des travées hépatiques présentant des images vacuolaires correspondant probablement à une dégénérescence graisseuse. Nombreux foyers disséminés nécrotiques et inflammatoires avec amas lympho-monocytaires et images de nécrose. Congestion marquée des capillaires. A l'examen direct, rares BK.

Poumons : Volumineuse zone de destruction du parenchyme pulmonaire : caséification centrale avec organisation épithélioïde et cellules géantes. Infiltrats lympho-mono-histiocytaires étendus. Dilacération et destruction du tissu élastique. Dans le reste du poumon, alvéolite congestive disséminée dans tout l'organe. Persistance partielle de la structure normale du tissu élastique. A proximité des zones de destruction, congestion œdémateuse intense avec infiltrats lympho-monohistiocytaires et peu de remaniements de l'anatomie microscopique de l'organe. A l'examen direct, rares BK.

Conclusion :

Atteinte de tuberculose massive de tous les organes avec réaction inflammatoire et congestive; foyers de nécrose disséminés.

Recherche du Bacille tuberculeux par culture :

Afin de compléter nos investigations par l'examen direct des coupes histologiques pour déceler le Bacille de Koch, nous avons jugé nécessaire de procéder à la culture sur milieu de Lœwenstein-Jensen. Nous avons ainsi prélevé dans les différentes séries, la rate et les ganglions inguinaux et lombaires que nous avons broyés et filtrés grossièrement sur gaze. Le liquide recueilli est introduit dans deux tubes à centrifugation remplis aux 2/3. On ajoute à chaque tube 2 cc d'un mélange éther +

ligroïne à parties égales. On agite fortement et on centrifuge pendant 10 minutes à 4 000 t/mn. Le liquide centrifugé présente trois couches, mais les bacilles tuberculeux sont pratiquement cantonnés dans la couche moyenne formant un gâteau entre la phase aqueuse et la phase éthérée. On prélève ce gâteau à l'aide d'un ensemenceur et nous l'avons mis en suspension dans 5 cc de soluté physiologique; nous en avons employé chaque fois 0,5 cc pour ensemencer les milieux de Lœwenstein-Jensen. Nous donnons dans le tableau suivant les résultats relevés après 40 jours de culture à 37°.

TABLEAU N° 11

Série	Organes	
	Ganglions	Rate
A	++	3 colonies
B	—	3 colonies
C	—	4 colonies
D	—	—
E	+++	+++

Comme il ressort de ce tableau, la série traitée par notre *antibiotique d'adaptation seul* donne encore un nombre important de colonies dans les tubes ensemencés avec le *broyat de ganglions*. Par contre, *le broyat de rate* donne un nombre de colonies beaucoup plus faible, mais toujours positif.

En ce qui concerne l'association *antibiotique d'adaptation* – *I.N.H.* ou + *Streptomycine*, elle amène une stérilisation définitive des ganglions, mais le broyat des rates donne toujours un développement restreint de colonies de BK.

Le meilleur résultat a été obtenu avec *l'association I.N.H.* + *Streptomycine* où tous les milieux sont restés stériles.

Interprétation :

Dans l'ensemble, nos expériences « *in vivo* » ont démontré une action antituberculeuse très nette de notre *antibiotique d'adaptation*. Employé seul, il a permis de stabiliser le processus infectieux, les lésions tuberculeuses ne sont plus au stade exsudatif et montrent une évolutivité très modérée. D'autre part, un grand nombre de formations folliculaires ont subi une transformation scléreuse et de vastes plages de nécrose montrent un métamorphisme scléro-hyalin. Ces différents caractères indiquent une tuberculose chronique qu'il n'est pas habituel d'observer chez le cobaye.

L'antibiotique associé à la Streptomycine a un effet thérapeutique renforcé et la synergie devient surtout apparente dans les lésions histopathologiques et microbiologiques des ganglions où, comme on le sait, la Streptomycine seule est peu active.

La même action infertilisante et sclérogène est obtenue par *l'association de notre antibiotique d'adaptation avec l'Isoniazide*, et ce traitement est à notre avis le plus favorable. Cependant, l'effet synergique de notre antibiotique d'adaptation avec l'un ou l'autre de ces antituberculeux classiques reste inférieur à celui de l'association I.N.H. + Streptomycine, du moins en ce qui concerne la tuberculose provoquée du cobaye. Dans la tuberculose humaine, notre antibiotique pourrait sûrement rendre de grands services en cas d'intolérance à l'un ou l'autre des antituberculeux classiques, ou de résistance de l'agent infectieux à l'un de ces médicaments.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Il est notoire que la tuberculose d'inoculation au cobaye, traitée par les antituberculeux spécifiques modernes qui amènent une guérison apparente, aboutit à la mort des animaux après cessation du traitement depuis un temps plus ou moins long. Il faut cependant reconnaître que ces tuberculostatiques *amènent assez souvent une guérison définitive de la tuberculose humaine.* Ce fait doit être attribué surtout aux moyens de défense du macro-organisme (élaboration d'anticorps dont l'homme est beaucoup plus capable que le cobaye). A ce point de vue, les conditions de lutte contre l'infection sont donc beaucoup plus favorables chez l'homme.

Comme le dit Risler, il importe de ne pas oublier la complexité de l'infection tuberculeuse qui relève en grande partie de la pathologie générale. L'élément prédominant dans ce syndrome pathologique demeure l'intoxication profonde de l'organisme par l'intermédiaire des poisons élaborés par le Bacille de Koch. Or, il est notoire que toute chimiothérapie spécifique a pour seul résultat la destruction du Bacille tuberculeux ou l'amoindrissement de sa vitalité. *Le traitement antituberculeux ne peut donc devenir définitivement salutaire que si l'on arrive à neutraliser les toxines et à renforcer les moyens d'immunisation naturelle de l'organisme.*

En partant de ce principe on peut admettre la justification de l'emploi de la chimiothérapie spécifique, chaque fois qu'elle vise à l'établissement, au sein de l'organisme, *d'un état immunitaire* que nous savons très complexe dans la tuberculose. Il n'est pas douteux que notre antibiotique d'adaptation constitue un moyen très efficace dans cet ordre d'idées, puisque, comme nous avons pu le montrer, il est dépourvu de toxicité et a un pouvoir antibiotique strictement spécifique contre le Bacille de Koch; celui-ci a forcé l'*Aspergillus amstelodami* à élaborer cette substance antituberculeuse dans la lutte de concurrence vitale qui les oppose.

Cet antibiotique d'adaptation touche donc essentiellement l'agent infectieux, sans faire apparaître d'effets secondaires imputables à la médication par formation de lésions organiques irréversibles ou par libération de substances toxiniques provenant des Bacilles de Koch détruits en masse.

Dans ce sens, *notre antibiotique d'adaptation est sûrement moins dangereux que la Streptomycine* et, associé à l'Isoniazide il permet à l'orga-

nisme de mobiliser au maximum ses moyens de défense idiogènes humoraux ou tissulaires.

Ainsi les résultats de nos recherches sur un antibiotique d'adaptation élaboré par Aspergillus amstelodami contre le Bacille tuberculeux confirment l'opinion optimiste de Charles NICOLLE, ce grand savant français mort en 1935, qui écrivait au sujet des maladies infectieuses et de leurs lois :

« *Nous devons avoir plus de foi dans notre action rapide et logique que dans les forces obscures hypothétiques et à longue échéance de la nature... Nous devons faire confiance à ceux qui nous suivront. Pacifiques et meilleurs, ils sauront de mieux en mieux se défendre, protéger leurs pareils et les animaux utiles à leur vie, contre la tourbe dantesque, mais inintelligente et indisciplinée, des maladies infectieuses.* »

BIBLIOGRAPHIE

(4) Bary (de). — *Die Erscheinung der Symbiose*, Strasbourg, 1879.

(28) Bernhart G. — Schweiz. med. Wochenschr., 1952, 82, 1335.

(17) Boinet et Rœser. — Bull. Thérapeutique, 1890, 119, 245.

(43) Burnet et Fenner. — *The Production of Antibodies*, New York, 1949.

(49) Bustinza. — *Les antibiotiques microbiens et la Pénicilline*, Paris, 1945.

(42) Cohn, Monod, Pollak et Spiegelmann. — Native, 1953, 172, 1096.

(58) Cramer. — *Papierchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim Bergstrasse, 1958.

(25) Creuze. — Bruxelles Médical, 1921, Biodynamisme, avril 1936.

(33) Crofton J. — Bull. Internat. Union Tubercul., 1953, 23, n° 3-4.

(36) Demerec M. — Journ. Bacteriol., 1948, 56, 63.

(48) Dubos. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1939, 40, 311; Journ. Exp. Med., 1939, 70, 1.

(21) Duchene. — Thèse Doct. Méd., Lyon. 1897.

(7) Duggar et Singleton. — Amer. Rev. Biochem., 1953, 22, 459.

(6) Ettlinger. — Mitt. Lebensmit. Unters. und Hyg., 1951, 42, 183.

(12) Ettlinger. — Schweiz. med. Wochenschr., 1955, 85, 272.

(10) Florey et Chain. — *Antibiotics*, Oxford University Press, 1949.

(38) Frey-Wissling. — *Submicroscopic morphology of protoplasm and derivatives.* Elsevier, Amsterdam, 1953.

(31) Fust B., Bruckner et Studer. — Ophtalmologica, 1953, 125, 1.

(20) Gasperini. — Ann. Microgr., 1890, 10, 449-74.

(51) Glauser. — Rev. méd. Suisse Rom., 1958, 78, 369.

(18) Gosio. — Riv. Ig. C. San. Pubbl., 1886, 7, 825.

(26) Gratia et Dath. — C.R. Soc. Biol., 1924, 91; 1925, 92; 1931, 106.

(16) Heer. — Deutsch. Med. Zeit., 1888, 60, 927.

(9) Heseltine W. W. — Pharm. Journ., 1956, 177, 428.

(62) Hinglais et Langlade. — Presse Médicale, 1956, 64, n° 39, 910.

(11) Hobby G. L. — Ann. N. Y. Acad. Sc., 1950, 53, 266.

(34) Keller, Krupe et Sons. — Arzneimittelforschung, 1955, 5, 170.

(57) Kolthoff. — *Säure-Basen Indikatoren*, Springer, Berlin, 1932.

(37) Liebermeister. — Zeitschr. Hyg., 1953, 137, 461.

(30) Mackaness G. B. — Journ. Path. Bact., 1952, 64, 429.

(14) Mainguy. — Thèse Doct. Vétér., Paris, 1949, Imprimerie Foulon.

(45) Mandelstam. — Biochem. Journ., 1952, 51, 674.

(54) Mangin. — Ann. Sc. Nat. Botan., 1909, série 9, vol. 10, 360.

(32) Medlar, Bernstein et Reeves. — Amer. Rev. Tuberc., 1951, 63, 449.

(35) Meyer J., Malgras J., Romond Ch. et Gueller J. P. — Bull. Ass. Dipl. Microbiol. Nancy, 1958, 71, 27.

(60) Michener et Andersen. — Science, 1949, 110, 68-69.

(39) Monod J. — Growth, 1947, 11, 232.

(41) Monod J. et Cohn. — Adv. Enzymol., 1952, 13, 67.

(61) Ohresser G. — *Propriétés physico-chimiques et antimicrobiennes des acides amers du Houblon.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg. 1958.

(3) Pasteur L. et Joubert J. — C.R. Acad. Sc., 1877, 85, 101.

(15) Pawlowsky. — Virchow's Archiv für Path. Anat. Phys., 1887, 105, 484.

(56) Pietre. — *Biochimie des protéines*, Baillières, Paris, 1937.

(23) Rappin. — Congrès internat. Path. Comp., Paris, 1912. Gazette Méd. de Nantes, 1912, 9 novembre; 1927, 25 mai; 1934, 1er avril.

(13) Risler J. — *Les complexes antibiotiques d'adaptation.* Pacombry, édit. Paris, 1950.

(50) Risler, German et Clegg. — C.R. Acad. Sc., 1949, 228, 345.

(29) Rossier et Wegmann. — Wiener Med. Woch., 1953, 103, 358.

(46) Sandoz S. A. — Triangel, 1953, 1, 94.

(47) Schiller. — Zentralbl. f. Bakt., 1924, 91, 103.

(59) Schurch P. — *La constitution des Tuberculines.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1958.

(40) Spiegelmann S. — Symp. Soc. exp. Biol., 1948, 2, 286.

(19) Stoos. — Ann. Suisse Sc. Méd., 1893, 3.

(22) Sturli. — Wiener Klin. Wochenschr., 1908, 211, 214.

(53) Thom et Raper. — *A Manual of the aspergillus*, Williams and Wilkins Comp. Baltimore, 1945.

(2) Tyndall J. — Phil. Trans. Roy. Soc. London, 1876, 166, 27.

(52) Vargues R. et Grenier B. — Rev. Méd. de Tours, 1961, 16, 417.

(24) Vaudremer. — Ann. Inst. Pasteur, 1910, 24, 189, C.R. Soc. Biol., 1912, 73, 501; 1913, 74, 278 et 752.

(1) Vuillemin P. — Assoc. Franç. Avanc. Sciences, 1889, 2e partie, 525.

(55) Vuillemin P. — Soc. Mycol. France, 1920, 36, 131.

(5) Waksman S. A. — *Microbial antagonisms and Antibiotic substances*, New York, 1947, 2e édition.

(27) Waksman S. A. — *Principles of soil Microbiology*, Baltimore, 1932.

(8) Walter A. et Heilmeyer L. — *Antibiotika-Fibel*, Thieme, Stuttgart, 1954.

(44) Yudkin J. — Biol. Rev., 1938, 13, 93.

Vu, Strasbourg, le 1er décembre 1961

Le Président du Jury,

R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 12 décembre 1961

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

Pour le Doyen :

L'Assesseur

G. GAZET DU CHATELIER

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 13 décembre 1961

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

J. F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5

PLAN DE TRAVAIL 7

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

L'Antibiose, principe vital 9

Les antibiotiques 10

Action antibactérienne des antibiotiques 11

CHAPITRE II

Problèmes soulevés par l'antibiothérapie et la chimiothérapie 15

Effets secondaires des antibiotiques sur le macro-organisme 15

Toxicité des antibiotiques 16

Action antivitaminique des antibiotiques 16

Les surinfections bactériennes et mycosiques consécutives à l'antibiothérapie 17

Résistance microbienne aux antibiotiques 17

Principes servant à éviter les dangers de l'antibiothérapie 18

CHAPITRE III

La thérapie antituberculeuse moderne 21

Traitement tuberculeux et résistance antibiotique 22

Mesures dirigées contre l'instauration de la résistance 22

Effets secondaires des tuberculostatiques les plus importants 23

CHAPITRE IV

Adaptation enzymatique 25

Cultures associées 27

Action spécifique des antibiotiques d'adaptation 29

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE V

Isolement et caractérisation d'Aspergillus amstelodami 31

CHAPITRE VI

Préparation d'un antituberculeux d'adaptation 36

Essais préliminaires 36

Préparation du milieu de culture de base 36

Extraction de l'antibiotique d'adaptation 38

Technique modifiée 39

Extraction de l'antibiotique 40

CHAPITRE VII

Propriétés physico-chimiques de l'antituberculeux d'adaptation 41

Aspect microscopique 41

Réactions chimiques 41

Chromatographie sur papier 42

CHAPITRE VIII

Expériences « in vitro » 47

Interprétation 49

CHAPITRE IX

Expériences « in vivo » 55

Interprétation 59

Résultats des examens anatomo-pathologiques 60

Étude des coupes histologiques 61

Recherche du Bacille tuberculeux par culture..... 65

Interprétation 66

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 69

BIBLIOGRAPHIE 71

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES
DE STRASBOURG

*

Dépôt légal N° 1127/1961